Глава 3

Мимикрии фармакогенополиморфизма

Межвидовые и внутривидовые вариации в скорости метаболизма лекарств и ксенобиотиков связаны с наследуемыми изменениями (*мутациями*) в генах, кодирующих ферменты метаболизма. Многие *мутагены* вызывают нарушения регуляции роста и деления клеток и поэтому являются *канцерогенными*. Мутация является важным *фактором биологической эволюции*. Высокая скорость изменений в структуре генов угрожает существованию индивидуальных организмов или целых видов. Клетки обладают механизмами коррекции изменений ДНК, вызываемых мутациями, которые могут возникать в результате ошибок в процессе репликации и рекомбинации ДНК при действии физических или химических факторов, ксенобиотиков и лекарств. Лекарства становятся все более активными, а фармакотерапевтические неудачи – все более драматичными [7, 8].




Существуют *толчковые мутации*, когда, например, цитозин превращается в урацил, в следующем цикле репликации образующий пару с аденином вместо гуанина. Эти изменения принимают необратимый характер под влиянием азотистой кислоты. Вставки или выпадения нуклеотидов, некратного трем, ведут к ошибочной трансляции всей ДНК. Мутации типа трансляции измененной мРНК не «узнаются» рибосомами, которые имеют совершенно иную аминокислотную последовательность, что значительно усложняет фармако- и токсикогенетические исследования.

Высокая прогностическая ценность положительных и отрицательных результатов генотипирования ферментов метаболизма веществ для прогнозирования нежелательных эффектов ксенобиотиков и неблагоприятных побочных реакций лекарств дала импульс развитию в России и за рубежом новых направлений – *фармакогеномики и токсикогеномики*, разработкам и внедрению *генетических микрочипов* методом *microarray-technology*, позволяющих выявлять одновременно батареи мутантных аллелей [33, 40, 43].

NB! В основе метаболизма лекарственных препаратов и ксенобиотиков в организме человека лежит преобразование их в водорастворимые фракции. Преобразования медикаментов и ксенобиотиков осуществляется в две фазы, а ферменты, ускоряющие их метаболизм, подвержены генетическому полиморфизму.

Генетический полиморфизм обеспечивает индивидуальные особенности метаболизма ксенобиотиков и лекарств. Он характерен как для ферментов I фазы метаболизма (изоферменты цитохрома Р-450, дигидропиримидин, дигидрогеназа, бутирилхолинэстераза), так и для ферментов II фазы (N-ацетилтрансфераза, тиопурин S-метилтрансфераза) [14].

Маркеры для Y-хромосомного Адама и митохондриальной Евы

Каким бы уникальным ни казался человек, его геном на 50% совпадет с геномом банана. А 125 млн. лет эволюции сохранили около 90% общих генов у мыши и человека. Почти на 99% совпадают ДНК человека и шимпанзе, а частоты индивидуальной вариабельности геномов разных людей составляют около 0,1%.




В настоящее время эффективным инструментом для определения геномных различий у животных и человека являются ДНК маркеры, основанные на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Основными преимуществами таких маркеров являются высокая степень диспергированности по геному, независимость от возраста и физиологического состояния животного, а также простота, надежность и воспроизводимость лабораторных манипуляций, необходимых для выявления маркеров.

В нашем Центре были проведены исследования, направленные на создание генетических стандартов пяти наиболее важных инбредных линий лабораторных мышей – BALB/c, DBA/2, CBA, C57BL/6 и C57BL/10. В этой работе мы использовали Inter-simple sequence repeat (ISSR)-ПЦР ДНК маркеры. Главный принцип, положенный в основу маркеров данного типа, заключается в том, что при амплификации геномной ДНК мышей разных линий с определенными праймерами образуется уникальный для каждой линии спектр продуктов, характеризующий ее геномную конституцию [9].

Как видно на рисунке 3.1, каждая линия обладает уникальным генетическим профилем, что позволяет использовать полученные данные для генотипирования животных инбредных линий, а также сделать вывод о том, что ISSR-ПЦР могут быть применены для выработки генетического стандарта инбредных линий и для мониторинга



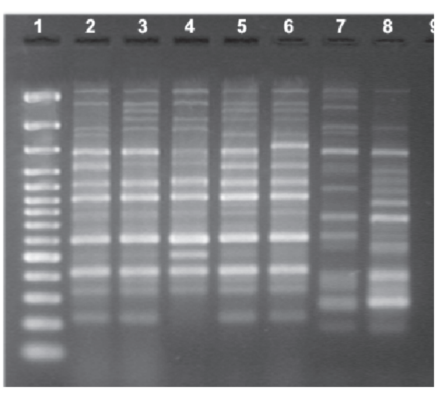


Рис. 3.1. Результаты ПЦР-амплификации геномной ДНК мышей и мини-свиней. 1 – маркер молекулярной массы; 2 – BALB/c; 3 – DBA2; 4 – CBA; 5 – C57B6; 6 – C57B10-GFP; 7 – Sus scrofa (3565); 8 – Sus scrofa (39); 9 – отрицательный контроль

лекарств в целях экстраполяции на человека.

Хотя все люди на 99,9% идентичны, но различия в их реагировании на лекарства стимулировали развитие фармакогенетических исследований. По полиморфизму ДНК можно оценить не только временные события в истории популяции, но и реакцию на лекарства [20].



Митохондриальная ДНК (мхДНК) передается только от матери, то есть по различиям мхДНК можно судить о том, сколько поколений отделяет их от Евы, первой женщины [16, 42]. По ДНК Y-хромосомы движутся эволюционные траектории по отцовской линии, поскольку Y-хромосома передавалась от Адама и только от отца к сыну. Оба типа полиморфизма ДНК дают раздельную информацию об отцовском и материнском вкладе в популяцию, включая и нюансы ферментативного метаболизма [22] лекарств. Скорости метаболизма ферментов, таким образом, генетически детерминированы, но зависят и от внешних факторов [4].



NB! *Маркерное фенотипирование* – это метод прямого определения активности того или иного фермента метаболизма лекарств и ксенобиотиков по кинетике их специфических «маркерных» субстратов и метаболитов этих субстратов у индивидуума или в популяции.

Специфичность ферментов метаболизма позволила разработать методы их гено- и фенотипирования. Активность ферментов метаболизма определяется по маркерным субстратам при измерении их концентраций и концентраций метаболитов в плазме крови или моче. *Метаболический индекс* равен отношению концентрации ксенобиотика к концентрации метаболита и имеет следующие варианты:

- ✓ *метаболический индекс* не меняется, если нарушено всасывание ксенобиотиков, о чем говорят низкие значения концентрации «маркерного» субстрата и низкие значения концентрации его метаболита в плазме крови;
- ✓ *низкий метаболический индекс* говорит о повышении активности фермента метаболизма, если установлены низкие значения концен-

трации «маркерного» субстрата и высокие значения концентрации его метаболита в плазме крови;

✓ *высокий метаболический индекс* связан со снижением активности фермента метаболизма, когда имеются высокие значения концентрации «маркерного» субстрата и низкие значения концентрации его метаболита в плазме крови.

Перспективным направлением оценки *мимикрии ферментов*, непосредственно связанным с проблемой изучения их генетического полиморфизма, является применение большого спектра *радиоактивных лигандов*. Это позволило идентифицировать генетические разновидности белков сыворотки крови, специфически связывающих и транспортирующих биологически активные вещества – ферменты, витамины, гормоны. Более перспективным подходом к исследованию генетического полиморфизма является *оценка спектральных характеристик* и *резонансных спектров* интересующих нас веществ.

NB! Явления «спектроскопии» представляют собой огромный набор методических приемов, основанных на анализе сигналов, идущих из молекул и атомов.




С помощью спектрометров – устройств, регистрирующих отклик молекул на действия излучений, измеряют *инфракрасный* (ИК) и *ультрафиолетовый* (УФ) *спектры*. Более сложным методом является *высокоэффективная хроматография* и *хромато-масс-спектроскопия*. Она позволяет взвесить молекулы и точно установить количество тех или иных атомов в молекуле. Но названные методы не позволяют установить, как атомы связаны друг с другом и какую форму имеет образуемая ими молекула. Привлечение для исследований в биохимии и генетике *СВЧ-техники*, *электронного парамагнитного резонанса* или *ЭПР-спектроскопии* позволили неразрушающими белки методами анализировать фенотипические особенности организмов в динамике, сверхточно оценивая характер кинетических процессов интра- и межмолекулярых отношений.

Поскольку в состав большинства ферментов входят ионы металлов – железо, медь, марганец, молибден, кобальт, ванадий, никель и др., ЭПР является наиболее оптимальным приемом для их изучения (рис. 3.2 и 3.3).

С этой точки зрения всесторонне изучены свойства ферментативных реакций ксантиноксидаз, альдегидроксидаз, дегидрогеназ, каталаз, пероксидаз, цитохромоксидаз и др. Исследованы *гем* и его окружение. Достаточно напомнить, что гем входит в состав пероксидазы, каталазы, цитохромов и многих других биологических молекул. На рис 3.2 изображен гем, то есть порфириновое кольцо с атомом

железа в центре; через пятую координационную связь к гему присоединяется глобин, через шестую – группа X (кислород, двуокись углерода и т.д).

На рис 3.3 приведена полученная с помощью ЭПР структура гема. В гемоглобине содержатся четыре гема, а значит, и четыре атома железа на молекулу, а в миоглобине – только один гем.

Стоит подчеркнуть, что перечисленные выше ферменты и многие другие белки являются естественными биохимическими маркерами генов и используются как для определения этнической принадлежности человека и популяции, так и для фармакогенотипирования.

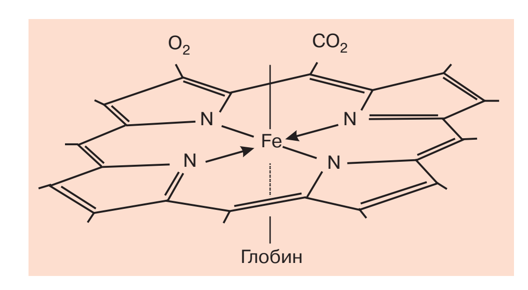


Рис. 3.2. Классическая рентгеноструктурная модель гема

По своей сути положение точки парамагнитного резонанса характеризует синглетную линию поглощения. Это означает, что значения поля, при котором имеет место резонанс, определяет величину g-фактора для данного свободного неспаренного электрона или неспаренного электрона, связанного с атомом или молекулой (рис. 3.3).





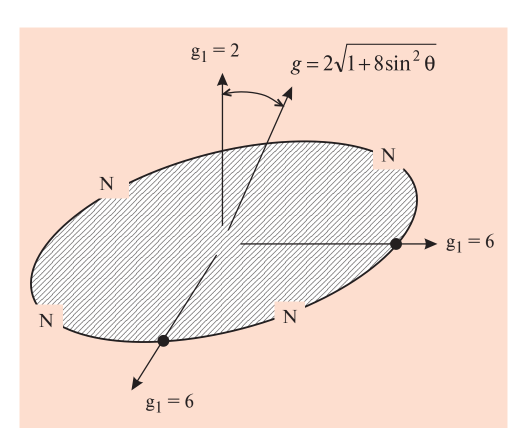


Рис. 3.3. Структура гема на основе ЭПР-спектроскопии. g-фактор отражает электронно-магнитный резонанс для свободного неспаренного электрона или неспаренного электрона, связанного с атомом или молекулой. Зависимость значения g-фактора у высокоспинового производного гемоглобина составляет в плоскости гема g = 6,0 во всех направлениях

Спектроскопическая информация может быть получена на основе *ядерного магнитного резонанса*, то есть ЯМР-спектрометром. С помощью этого прибора измеряется магнитное поле, создаваемое каждым атомом, например водорода, находящегося в различных окружениях микрочастиц. Существуют и другие, к сожалению, чрезвычайно дорогостоящие принципы исследования резонансных спектров.

Большой толчок генетическим исследованиям, наряду с классической физикой, дала ядерная физика и радиационная медицина. Эти два направления позволили по-иному взглянуть на процессы физической химии в биологии и медицине. К началу 70-х годов XX века стала понятна роль *неспаренных электронов* и *свободных радикалов* в кинетике ферментативных реакций и иных каталитических процессах, в изучении структуры молекул, механизмах повреждения и защитных механизмов тканей.

В последние годы в арсенал исследователей наряду с ЭПР вошли методы *двойного электронно-ядерного резонанса* (ДЭЯР), *спектроскопии Мессбауэра* или *ядерного γ-резонанса* (ЯГР). Суть этих методов заключена в способности неспаренных электронов, обладающих собственным моментом количества движений или угловым моментом, называемым спином, под воздействием магнитного или электронного поля приобретать общую координационную ось.




В отсутствие такого воздействия спины неспаренных электронов в ферментах, свободных радикалах и других молекулах ориентированы случайным образом. При наложении же внешнего магнитного, электрического или γ-поля неспаренные электроны разделятся на две группы: у одних *спины* будут ориентированы параллельно, а у других – антипараллельно направлению поля. Все вещества, содержащие неспаренные электроны, подразделяются на две группы. В *первой группе* неспаренные электроны связаны со всей молекулой или большей ее частью. Во *второй группе* неспаренные электроны обычно связаны с атомами переходной группы – железом, кобальтом, медью, никелем и др., а их число в атоме, как и энергия, изменяется с изменением валентности этих атомов.

При планировании экспериментов с целью поиска *генетических маркеров*, свойственных во всей полноте биохимическим и физиологическим процессам, следует не только констатировать наличие того или иного фермента у человека и животного, а соотносить его со всей гаммой эффектов, вызываемых им, например, при интерполяции этнофармакологических исследований на людях в отношении определенных линий генномодифицированных животных.

NB! Трансгенные животные могут, с одной стороны, идеально моделировать эффекты лекарства в отношении ориентала, но, с другой стороны, не отразить тяжелое побочное действие в отношении кавказоида. Именно поэтому моделирование процессов фармакогенетического полиморфизма является одной из наиболее сложных областей биомоделирования.

Вне зависимости от того, какая модель будет разработана или предпочтена для исследования фенотипических особенностей и гене-

тического полиморфизма, метод *ЭПР-спектроскопии* будет оставаться неким тестовым приемом, позволяющим соотносить в единой системе разные данные, позволяющие оценить *мимикрию ферментов*. Однако в поиске новых принципов биомоделирования и экстраполяции с животных на человека, следует помнить, что *генетические маркеры-ферменты* являются прежде всего катализаторами, то есть функционально увеличивающими скорости биохимических реакций.

Эти ферменты-маркеры не только высокоэффективны, но и строго специфичны по отношению к субстрату катализа. Существуют *абсолютно специфичные* ферменты, например, уреаза, гидролизирующая мочевину до CO_2 и аммиака, *группо-специфичные* – например, пепсин, действующий на пептиды с ароматическими группами, а также ферменты, специфичные к определенному *типу реакций* или *химической связи*. Существует и группа ферментов, специфичных к *стереоизомерам* субстратов, например, лактатдегидрогеназа, катализирующая окисление только L-формы молочной кислоты.



Благодаря использованию новых маркеров, к началу XXI века установлено, что митохондриальные геномы представлены комбинациями расовых групп типов мхДНК, каждая из которых ведет происхождение от единственного основателя – праматери Евы. А вот был ли единственным праотцом Y-хромосомный Адам, еще предстоит доказать [36].



Модели ферментации лекарств

Многие лекарства и ксенобиотики являются химическими мутагенами. Так, производные *азотистой кислоты* (HNO_2) и гидроксиламин (NH_2OH) дезаминируют азотистые основания, то есть превращают цитозин в урацил, а аденин – в инозин. *Алкилирующие соединения* имеют реакционные группы, которые могут образовывать ковалентные связи с азотистыми основаниями, входящими в ДНК. *Метилнитрозамины* распадаются с образованием реакционноспособного метилкатиона (CH_3^-), который метилирует группы OH и NH_2 в ДНК. *Бензпирен* в результате метаболической трансформации в виде гидроксилирования одного из колец превращается в *реакционноспособный эпоксид*, который алкилирует аминогруппу гуанина и других азотистых оснований. Свободный радикал бензпирена токсичен, а эпоксид – канцерогенен. Мутации передаются из поколения в поколение и распространяются в популяции.

NB! Наличие в популяции различных аллельных вариантов одного и того же гена фермента метаболизма ксенобиотиков и лекарств обеспечивает *генетический полиморфизм*.

Использование метода *полимеразной цепной реакции* (ПЦР) дало возможность выявлять интересующие маркеры. Методы *генотипирования ферментов метаболизма* ксенобиотиков позволяют прогнозировать токсикологический или фармакологический ответ, повысить эффективность и безопасность ксенобиотиков.

NB! *Генотипирование* представляет собой «косвенный» метод определения активности того или иного фермента метаболизма ксенобиотиков на основании изучения его гена методом ПЦР.

Попытки математического моделирования фармакоферментативных реакций дают столь сложные уравнения, что они становятся мало приемлемы для реального использования. Самой удобной оказалась простая модель Михаэлиса-Ментен, разработанная в 1913 г. Она объясняет характерную гиперболическую зависимость активности фермента от концентрации субстрата и позволяет получать константы, которые количественно характеризуют эффективность фермента.



Рис. 3.4. Модель Михаэлиса-Ментен



Модель Михаэлиса-Ментен исходит из того, что вначале субстрат *A* образует с ферментом *E* комплекс, который превращается в продукт *B* намного быстрее, чем в отсутствие фермента. Константа скорости $k_{кат}$ намного выше, чем константа некаталитической реакции k. Константу $k_{кат}$ называют еще «*числом оборотов*», поскольку она соответствует числу молекул субстрата, превращаемых в продукт одной молекулой фермента за 1 с. Согласно этой модели, активность фермента определяется долей комплекса *EA* от общей концентрации фермента $[E]_t$, то есть отношением $[EA]/[E]_t$. С целью упрощения модель предполагает, что *E*, *A* и *EA* находятся в химическом равновесии согласно закону действующих масс, что дает в итоге для диссоциации комплекса *EA* уравнение:

$$[E][A] \ / \ [EA] = K_m. \quad (3.1)$$

Поскольку

$$[E]_t = [E] + [EA], \quad (3.2)$$

$$[EA] = [E]_t[A] \ / \ (K_m + [A]). \quad (3.3)$$

Из $v = k_{кат}[EA]$ и (3.1 и 3.3) получают уравнение Михаэлиса-Ментен.

Два параметра уравнения не зависят от концентрации субстрата [A], но характеризуют свойства фермента. Произведение $k_{кат}[E]_t$ соответствует *максимальной скорости реакции* V при высокой концентрации субстрата, а *константа Михаэлиса* K_m характеризует *сродство* фермента к субстрату. Константа Михаэлиса численно равна той концентрации субстрата [A], при которой ν достигает половины максимальной величины V (если $v = V/2$, то $[A] / (K_m + [A]) = 1/2$, то есть $K_m = [A]$). Высокое сродство фермента к субстрату характеризуется *низкой величиной* K_m и наоборот. Конечно же, модель Михаэлиса-Ментен математически не совсем корректна, поскольку основывается на нескольких не совсем реальных допущениях. Они предполагают необратимое превращение EA в $E + B$, достижение равновесия между E, A и EA, отсутствие в растворе других форм фермента, кроме E и EA. Только при соблюдении этих допущений K_m соответствует константе диссоциации комплекса, а k_m – константе скорости реакции $EA \rightarrow E + B$. Несмотря на определенную условность уравнения Михаэлиса-Ментен оно с честью выдержало почти столетнее испытание и признано базовым во всех построениях в фармакокинетике, токсикокинетике и оценке биоэквивалентности лекарств [4].




Уравнение Михаэлиса-Ментен можно линеаризовать в виде графика Иди-Хофсти (рис. 3.5). При построении графика зависимости v от $v/[A]$ путем линейной аппроксимации более точно определяются V и K_m. Специальные компьютерные программы моделирования ферментативной кинетики дают максимально правдоподобные *мультикомпартментные модели* фармакокинетики лекарств и их биоэквивалентности.

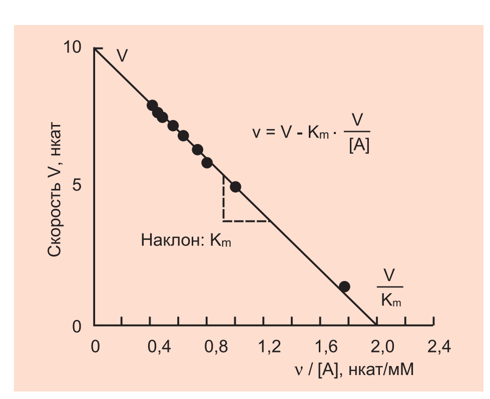


Рис. 3.5. График Иди-Хофсти

Почти все ферменты являются белками, хотя известны каталитически активные нуклеиновые кислоты — «рибозимы».

Активность фермента выражают в *каталах*: 1 кат — это количество фермента, которое превращает 1 моль субстрата за 1 с. Другой единицей активности является *международная единица* (Е) — количество фермента, превращающего 1 мкмоль субстрата в 1 мин (1 Е = 16,7 нкат).

На сегодняшний день известно примерно 2000 различных ферментов, которые классифицированы в шесть классов. *Оксидоредуктазы*

(класс 1) катализируют окислительно-восстановительные реакции, а *трансферазы* (класс 2) переносят ту или иную функциональную группу от одного субстрата на другой. *Гидролазы* (класс 3) участвуют в переносе групп, а акцептором является молекула воды. *Лиазы* (класс 4), или «синтазы», катализируют с образованием или исчезновением двойных связей расщепление или образование химических соединений. *Изомеразы* (класс 5) перемещают группы в пределах молекулы без изменения общей формулы субстрата. *Лигазы* («синтазы», класс 6) катализируют энергозависимые реакции присоединения с участием АТФ и других нуклеозидтрифосфатов.

Моделирование ферментативных реакций метаболизма лекарств и ксенобиотиков развивается на основе новых и пополняемых знаний о полиморфизме этих процессов. В последнее десятилетие стало известно, что оксид азота (NO) участвует в регуляции внутриклеточных концентраций Ca^{2+} у млекопитающих. По крайней мере один из механизмов регуляции не связан с активацией синтеза NO, увеличением внутриклеточной концентрации с ГМФ, и активации Ca^{2+}-насоса через систему киназ эндоплазматического ретикулума. На рис. 3.6. показана система участия нитрит-редуктазной системы в окислительных процессах [13].



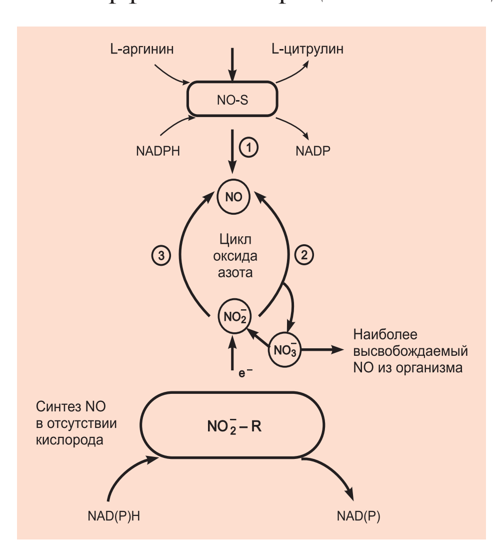


Рис. 3.6. NO-синтазный и нитрит-редуктазный (NO_2-R) компоненты азотного окислительного цикла у млекопитающих: формирование оксида азота в NO-синтазных реакциях (1); окисление NO в NO_2 и NO_3 ионы (2); NO_2-превращение в NO с участием нитрит-редуктазной системы (3), и точки приложения действия лекарств и ксенобиотиков



У млекопитающих NO ферментация происходит из остатка L-аргинина в семействе трех изоэнзимов. Ферментативное происхождение NO обеспечивается путем L-Arg $\rightarrow$ NO $\rightarrow$ NO_2 $\rightarrow$ NO_3. Преобразование NO_2-ионов в NO происходит через нитрит-редуктазную реакцию: $NO_2 + e \rightarrow NO$. Это превращение производится системами электронного донорства с участием NADH, NADPH, флавопротеинов и цитохром оксидазы в митохондриях, а структурно-функционально NADH, NADPH, флавопротеины, и цитохром P-450 в эндо-



плазматическом ретикулуме. В свою очередь превращение NO_2-ионов в NO катализируется в эритроцитах системами электронного донорства с участием NADH, NADPH, флавопротеинов и диоксигемоглобина (рис. 3.6).

При биомоделировании следует помнить, что нормальное содержание гемоглобина (Hb) в крови млекопитающих составляет от 110 до 160 г/литр или ~$2\cdot10^{-3}$ мМ, что означает равенство 10-15% Hb-NO комплекса ~$2\cdot10^{-4}$ мМ. У млекопитающих нитрит-редуктазная активность, по крайней мере, в 1000 раз выше, чем таковая для NO-синтазы [4, 5, 12].

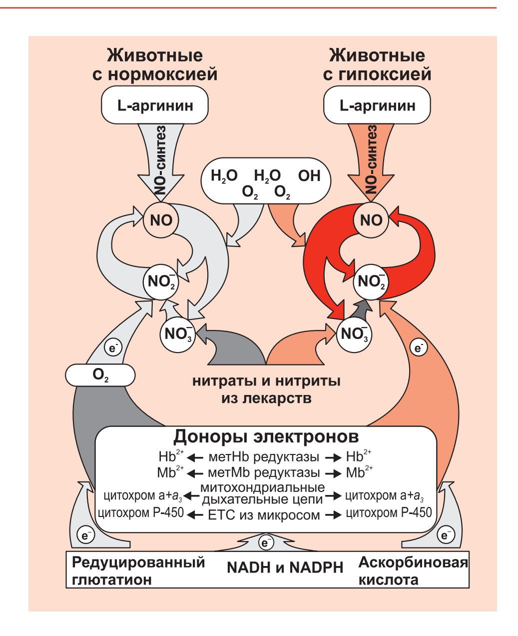


Рис. 3.7 Оксидазотные циклы, протекающие при нормоксии (слева) и в условиях гипоксии (справа) животных-моделей для оценки фармакодинамики и изучения механизмов действия лекарственных средств




Несмотря на 120-летнюю историю исследования действия нитритов и нитратов на человека и животных, механизмы окисления гемоглобина, участвующего в нем NO_2 и соответствующих реакций еще не до конца поняты. Прежние модели оксидазотных механизмов фармакологами, токсикологами и биохимиками строились только в метHb-продуцирующей активности NO_2 в крови, клетках и тканях млекопитающих без учета нитрит-редуктазной активности белков, пептидов и иных низкомолекулярных соединений.

Выяснение механизмов действия антиоксидантов и огромного числа лекарств и ксенобиотиков на окислительные процессы организма требуют проведения сравнительных исследований у интактных животных и в условиях гипоксии, а лучше на моделях чувствительных и оппозитных к гипоксии линий. В лаборатории геномики нашего Центра получены линии крыс, высокочувствительных и оппозитных (см. схему на рис. 3.7) в отношении гипоксии [5].

Показана роль кислорода для энзиматического окисления L-аргинина с участием оксида азота [12]. Для обычных условий NO-синтазный механизм не должен ингибироваться, как это происходит при гипоксии и ишемических расстройствах. Кроме того, представлены нитрит-ре-

дуктазные механизмы, связанные с генсодержащими белками, Hb, Mb, цитохром оксидазы и цитохром P-450. Кислород угнетает (рис. 3.7) нитрит-редуктазную активность генсодержащих белков у животных [5].

Действительно, эти данные делают NO_2 и нитрит-редуктазный комплекс у млекопитающих составной частью системы, которая хотя и не участвует в NO-синтезе, но обладает активностью в 103 раза большей, чем у NO-цикла. Моделирование ферментативных реакций, обеспечивающих биотрансформацию лекарств и ксенобиотиков, не всегда может быть описана в рамках моделей Михаэлиса-Ментен и построений Иди-Хофсти. По-видимому, требуются более приближенные и адекватные модели для описания этих процессов, что мы видим уже в приведенных примерах метаболических процессов окислительного характера.

Транспортеры лекарств и ксенобиотиков

Генетический полиморфизм играет исключительно важную роль в адаптационных механизмах защиты от ксенобиотиков. Наряду с поринами и трансмембранными каналообразующими белками в мембранах митохондрий, существует большое семейство транспортных белков. Расшифрованы далеко не все [18].




В качестве примера напомним механизмы работы переносчика глюкозы, содержащего 12 трансмембранных α-спиральных фрагментов и один олигосахарид, ориентированный в окружающую среду. Переносчики глюкозы представляют собой семейство структурно близких мембранных белков с различными функциями. ГЛУТ-1 и ГЛУТ-3 имеют высокое сродство к глюкозе (K_d около 1 мМ). Они обнаружены почти во всех клетках, где обеспечивают постоянное поступление глюкозы. ГЛУТ-2 найден в клетках печени и поджелудочной железы. Этот переносчик обладает гораздо меньшим сродством к глюкозе (K_d 15-20 мМ). Это означает, что связывание глюкозы ГЛУТ-2 пропорционально концентрации глюкозы в крови. ГЛУТ-4 с K_d около 5 мМ найден в плазматической мембране мышечных и жировых клеток.

Системы (АТФ-аз), транспортирующие ионы K^+ и Na^+, относятся к группе *транспортных белков*. Они осуществляют АТФ-зависимый активный транспорт через мембраны различных веществ: от неорганических катионов до пептидов и неполярных соединений, например лекарственных веществ и белков, обеспечивающих множественную лекарственную устойчивость. Важнейшая транспортная роль принадлежит *Na^+/K^+-обменивающей АТФ-азе*, которая присутствует в плазматической мембране практически всех животных клеток в виде мембранного гликопротеина, состоящего из четырех субъединиц ($\alpha_2\beta_2$).



Цитоплазматическая область фермента участвует в реакционном цикле фосфорилирования/дефосфорилирования, принимая попеременно два конформационных состояния, ответственных за транспорт ионов. При расходовании одной молекулы АТФ из клетки «выкачивается» три иона Na^+ в обмен на поступающие два иона K^+. Этот «насос» обеспечивает непрерывное поддержание неравновесного распределения ионов Na^+ и K^+ между цитоплазмой клетки и окружающей средой.

P-гликопротеин (P-gp). Транспортные белки играют важную роль в регуляции абсорбции, распределения и экскреции многих лекарств. Наиболее изученными среди них являются члены семейства аденозинтрифосфатов, АТФ-связывающей кассеты [39]. *P-гликопротеин* кодируется геном человека ABCB1, именуемым также MDR1. P-гликопротеин (P-gp) принадлежит к семейству плазменно-мембранных белков, кодируемых MDR генами и действует как *трансмембранная помпа*, удаляющая лекарственные средства из клеточной мембраны и цитоплазмы [19, 21, 34].



NB! В исследованиях на животных-моделях показано, что в силу генетического полиморфизма, многие часто используемые лекарства изменяют функции P-gp и транспортируются с ее участием.



Например, *дексаметазон, морфин, рифампин, кверцетин* повышают активность P-gp, тогда как *верапамил, циклоспорин A, эритромицин, флуоксетин, прогестерон, ингибиторы ВИЧ-протеазы* и некоторые *статины* ингибируют P-gp активность.

Рандомизированные клинические исследования демонстрируют, что субстрат P-gp антибиотик *рифампин* улучшает познавательные способности у пациентов с болезнью Альцгеймера после 12 месяцев лечения. Это улучшение познавательных функций не проявлялось в связи с применением антибиотиков. Влияние рифампина на познавательные способности могут быть связаны со снижением очищения амилоида β (Aβ) из мозга на пути транспорта P-gp-посредника [26].

Истекающий транспорт Aβ через барьер кровь–мозг является вкладом в выносе Aβ из мозга. P-gp высоко отзывчив в капиллярном эндотелии клеток мозга и вносит свой вклад в барьер кровь – мозг. У мышей с нулевым P-гликопротеином при микроинъекции $[^{125}I]A\beta_{40}$ и $[^{125}I]A\beta_{42}$ очищается в ЦНС половина нормы, которую они очищали у трансгенных мышей WT линии. Когда наблюдали амилоид-прекурсорных *протеин-трансгенных* мышей по ингибитору P-gp, уровень Aβ внутри интерстициальной мозговой жидкости существенно повышался во время часового лечения. Амилоид-прекурсорные протеин-трансгенные мыши с нулевым P-gp давали повышение уровня Aβ в мозге

и повышение Aβ остатка по сравнению с амилоид-прекурсорными протеин-трансгенными P-gp WT мышами. Эти данные устанавливают прямую связь между P-gp и метаболизмом Aβ *in vivo* и определяет трансгенных P-gp WT мышей в качестве новых животных-моделей для оценки транспорта лекарств и ксенобиотиков [28].

Поиск транспортеров лекарств и ксенобиотиков продолжается и, надо думать, это отнюдь не короткий путь. На данном этапе прогресс в области изучения механизмов и развитие технологий направленного транспорта лекарств связан с нанотехнологической революцией. Именно *нанотехнологии* дают основание надеяться на выяснение интимных процессов взаимодействия лекарств и ксенобиотиков с белками транспортных систем. Не вдаваясь в детали, отметим лишь, что доказанными транспортерами являются гаптоглобин и церулоплазмин.

***Гаптоглобин* (*Hb*)** является α_2-гликопротеином, генетически определенная молекула гетерогенного гаптоглобина, характеризуется главными фенотипными формами Hp 1-1, Hp 2-1 и Hp 2-2, связаны с ясными клиническими проявлениями. Содержание, которого в норме составляет 25-30% всей α_2-глобулиновой фракции и 1-2% – белков сыворотки, однако концентрация его в обычных условиях может сильно варьировать. Наиболее характерным свойством гаптоглобина является способность образовывать с гемоглобином трудно диссоциирующий комплекс. Гемоглобинсвязывающий белок содержит около 83% чистого белка, остальные 17% приходятся на углеводные компоненты.




Мировое распределение факторов Hp представляет существенный интерес в антропологическом отношении. Так, различные по происхождению популяции, живущие в экваториальной и тропических зонах Африки, Америки, Океании, характеризуются весьма высокой концентрацией аллели Hp 1. Население Индийского субконтинента и Австралии отличается самыми высокими частотами Hp 2 в общемировом отношении. Народы Европы имеют промежуточные частоты аллелей Hp, где в среднем концентрация первой аллели колеблется в пределах 0,38-0,40. Монголоидам свойственны относительно низкие величины.

У людей общий полиморфизм гаптоглобина, характеризующегося аллелями Hp 1 и Hp 2, дает рост структурного и функционального распознавания фенотипов протеина гаптоглобина, известного как Hp 1-1, Hp 2-1 и Hp 2-2. Принципиальные отличия между аллелями Hp 1 и Hp 2 представлены в дублированном сегменте ДНК ~1700 базовых пар нуклеотидов в Hp 2, но не в Hp 1. Наиболее вероятно, формирование аллели Hp 2 является результатом разрыва и переформирования события из негомогенных позиций внутри четвертого и второго интрона двух генов Hp 1. Как последовательность этого иллегитимного собы-

тия кроссинговера, экзоны 5 и 6 аллели Hp 2 является оригиналом из экзонов 3 и 4, соответственно, одного из этих Hp 1 генов.

Полиморфизм гаптоглобина Hp 1/2 связан с наличием инфекции, болезнями иммунитета, сердечно-сосудистыми болезнями и другими нарушениями, таким образом, ожидается широкая клиническая возможность использования [1]. Например, фенотип Hp 2-2 был представлен еще раз у пациентов с сильной формой нарушений в миокарде. Было выяснено, что фенотип Hp 1-1 дает защиту от двух клинических сосудистых осложнений при диабетическом меллите: диабетической нефропатии и повторного стеноза после коронарной ангиопластики.

NB! Образование комплекса Hp-Hb предотвращает выведение из организма через почки находящегося в крови свободного гемоглобина. В то же время этот комплекс является транспортером лекарств частично тех и по тому же механизму, как и у P-gp.




Роль Hp-Hb активно исследуется. Однако уже сейчас ясна его прогностическая роль. Так, пациенты с диабетом гомозиготны по гаптоглобину Hp 1 аллель (Hp 1-1) и имеют некоторые сосудистые осложнения. Показано, что тип Hp относится к пациентам с диабетом, страдающим острой недостаточностью миокарда. Оценено взаимодействие между типом Hp, 30-дневной смертностью и сердечной недостаточностью у 1437 пациентов, из них 506 с диабетом. Многовариантная логистическая регрессия показала существенность взаимодействия между типом Hp и статусом диабета в исходных данных. Тип Hp не влиял на результат среди пациентов с диабетом. В противоположность этому, Hp 1-1 был связан с первичной точкой смерти (OR 0,14, P = 0,015) и для смерти и сердечной недостаточности (OR 0,35; 95% CI 0,15-0,86, P = 0,018) [18]. Тип Hp является важной прогностической детерминантой и, по-видимому, перспективным маркером для оценки фармакокинетики и фармакодинамики лекарств.

***Церулоплазмин* (*Cp*).** Альфа-2-гликопротеин сыворотки крови, обладающий оксидазной активностью (атакует p-фенилендиамин и некоторые фенолы), является основным белком, который связывает и транспортирует ионы меди (более 90% меди в плазме). Эта фракция содержит около 7% карбогидратов, а концентрация ее в плазме клинически здоровых взрослых составляет 35-38 мг/100 мл. Отмечена низкая оксидазная активность церулоплазмина у новорожденных, а у женщин при беременности она увеличивается. Выявлены и этнические различия в иммунохимических характеристиках церулоплазмина. Показано, что Cp является мономерным белком с молекулярной массой 135 кДа, очень чувствительным к протеолитическому расщеплению.

Доказаны транспортные способности Ср в отношении ряда лекарств и ксенобиотиков.

Продукты «гена устойчивости» к лекарствам

Ген MDR1 продукт является членом семьи кассеты транспортеров, связывающих АТФ. P-gp использует энергию, перенесенную из гидролиза АТФ, для выкачивания широкого ряда составляющих вне клетки, включая большое число клинически используемых лекарств. Эта активность имеет значение для фармакокинетики и фармакодинамики. Например, P-gp проникает внутрь апикальных мембран интестинальных, почечных и эпителиальных клеток печени, где он влияет на абсорбцию и удаление их субстратов[32].

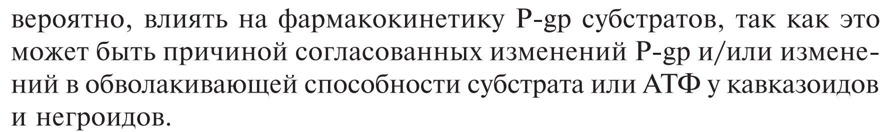
P-gp также размещается внутри апикальных мембран клеток капиллярного эндотелия мозга, где он может ограничивать проникновение лекарств в ЦНС. В добавление к роли P-gp в абсорбции, распределении и выведении, сверхвыражение P-gp связано с развитием фенотипа устойчивости ко многим лекарствам (MDR) некоторых раковых клеток. Следовательно, P-gp ингибиторы теперь являются агентами поворота MDR. Основной функцией P-gp является энергозависимый трансмембранный транспорт субстратов, таких, как билирубин, противоопухолевые лекарства, сердечные гликозиды, иммуносупрессоры, глюкокортикоиды, ингибиторы протеаз 1 типа вируса иммунодефицита человека, и многие другие лекарства. Экспрессия Р-гликопротеина во многих тканях показывает его роль в экскреции ксенобиотиков и метаболитов в мочу, желчь и содержимое кишечника.




NB! Р-гликопротеин является продуктом «*гена устойчивости*» ко многим лекарствам - MDR1 и локализуется в таких тканях, как мозг, интестинальные органы, почки, печень и др., где он играет важную роль в *защите от ксенобиотиков* и *токсикантов*.

В настоящее время, несколько простых нуклеотидных полиморфизмов (SNP) были идентифицированы в гене MDR1. Субъекты с мутантными аллелями, содержащими «*тихий*» *полиморфизм,* C345T гена MDR1 показали низкую экспрессию P-gp.

В дальнейшем SNP T-129C и G2677A/T (Ala893Thr/Ser) были связаны с более низкой экспрессией P-gp в плаценте. В противовес этому, субъекты с мутантной аллелью, содержащей C343T, показали более высокую экспрессию MDR1 мРНК в дуоденуме по сравнению с уровнем, который имела дикая аллель, и значения площади под кривой концентрации (AUC) для P-gp субстрата были более низкими. Любое продуцирование SNP в аминокислотном замещении может,



вероятно, влиять на фармакокинетику P-gp субстратов, так как это может быть причиной согласованных изменений P-gp и/или изменений в обволакивающей способности субстрата или АТФ у кавказоидов и негроидов.

К настоящему времени следующие SNP в гене MDR1, управляющие аминокислотным замещением, были идентифицированы: A61G (Asn21Asp) в экзоне 2, T307C (Phe103Leu) в экзоне 5, G1199A (Ser400-Asn) в экзоне 11, G2677T (Ala893Ser) в экзоне 21, G2677A (Ala893Thr) в экзоне 21 и A2956G (Met986Val) в экзоне 24. У здоровых японцев открыт новый SNP, связанный с аминокислотным замещением в экзоне 5 гена MDR1, управляющего аминокислотным замещением (Glu108Lys), влияющий на функции P-gp [37].

О роли «тихих» мутаций и полиморфизмов в фармакокинетике




Появилось большое число работ, посвященных открытию и первоначальной характеристике вариантов MDR1. У человека и животных было определено более 20 мутаций гена MDR1. У людей, однако, были определены функциональные и клинические последовательности одной общей варианты MDR1 – C3435T, изначально определенные у представителей кавказоидной расы. Была найдена корреляция C3435T с P-gp экспрессией в дуоденуме, определенная количественной иммуногистологией как пятна Western ($P = 0{,}056$). Индивидуумы с генотипом CC ($n = 6$) имели более высокий уровень P-gp экспрессии, приблизительно в 2 раза, по сравнению с индивидуумами с генотипом TT ($n = 5$); гетерозиготы имели уровни промежуточной экспрессии ($n = 10$).

NB! Поскольку C3435T является «*тихой*» *мутацией* и не дает в результате изменений в последовательности P-gp, то C3435T может быть связана с другими вариантами в гене MDR1 [35].

Понимание функциональных и клинических последовательностей вариантов MDR1 является важным, так как учет изменчивости при мутации гена MDR1 дал бы путь выбора подходящей дозы на основе генотипа MDR1 пациентов. Более того, варианты MDR1 могли бы быть важны для фармакодинамики: пациенты, являющиеся носителями нуль-аллелей MDR1, если такие аллели существуют, должны быть неотзывчивы на ингибиторы P-gp, использованными как агенты поворота MDR в процессе лечения рака.

Большое число субстратов P-gp, включая *дигоксин* и *циклоспорин A*, показывают внутрииндивидуальную изменчивость в *фармакокинетике*. Некоторые из этих изменений могли бы быть атрибутами факторов

внешней среды, но это также является причиной для прогноза того, что некоторые из этих вариаций повышаются в соответствии с генетическими факторами, включая мутации в генах, включенных в метаболизм лекарств и транспорт, таких как MDR1 [38].

Субстратами P-gp являются также *дигоксин, нифедипин, ловастатин, фексофенадин* и другие, а веществами, снижающими активность – *верапамил, хинидин, кетоконазол.* Географические, этнические и расовые различия в частоте полиморфных аллелей являются базисом, по крайней мере, для нескольких выявленных различий в фармакокинетике лекарственного эффекта или токсичности между популяциями. Полиморфизм в 26 экзоне, в позиции 3435(C3435T), не вызывает изменения в аминокислотах, но влияет на уровень экспрессии Р-гликопротеина в тонком кишечнике и, соответственно, на кишечную абсорбцию субстратов Р-гликопротеина. Так, выделяют два генотипа С и Т по наличию С или Т аллелей соответственно, где Т аллель ассоциируется с редукцией экспрессии Р- гликопротеина, а С аллель с индукцией Р-гликопротеина.




Лекарственные средства, особенно в условиях полипрагмазии различных по структуре и механизмам действия препаратов, оказываются часто токсичными для организма. Фармакодинамика и механизмы действия лекарств определяются активацией или ингибированием процессов [1], к которым относятся повышение экспрессии генов трансмембранных транспортных белков, выводящих препараты из клетки. Как мы отмечали, наиболее важным среди них является P-gp. Разработка новых биомедицинских технологий ориентирована на действия лекарств специфической направленности, обусловленной функционированием P-gp. Целью биомоделирования в этой области может стать система *направленного транспорта* (см. также главу 5).

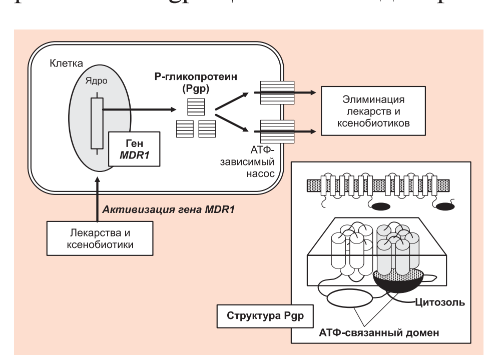


Рис. 3.8. Обобщенная схема внутриклеточного транспорта и элиминации лекарств и ксенобиотиков из клетки

NB! Конъюгаты лекарств и ксенобиотиков с белковыми векторами обеспечивают их перенос в клетку за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза в процессе связывания рецептора с лигандом (рис. 3.8).

Для фармакомоделирования этого процесса могут быть использованы полимерные *наночастицы.* Их применение

для направленной доставки лекарств в опухолевые клетки позволило в ряде случаев достичь положительных результатов [12].

При моделировании направленного транспорта лекарств используется перенос ковалентно или нековалентно связанного с векторной молекулой вещества, в клетку-мишень в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза. Рецептор-опосредованный эндоцитоз представляет собой сложный механизм, используемый клетками для выборочной интернализации белков цитоплазматической мембраны (см. главу 5). Белки являются рецепторами на клеточной поверхности для внеклеточных лигандов [30, 31].

Поскольку ген MDR1 выражается во многих нормальных тканях и типах клеток, важно установить, является ли мутация изменения экспрессии P-gp присущей исключительно дуоденуму, посредством влияния только лекарственной абсорбции, или экспрессия является изменением в других тканях в результате вариаций в *распределении*, *элиминации* или обоих этих процессов.

NB! Используя оценку выведения *родамина* как меру P-gp активности, проверена активность P-gp в клетках CD56+ природных киллеров от здоровых субъектов с различными генотипами на локусе 3435. Доказано, что родамин является субстратом P-gp.




Клетки CD56+ от индивидуумов с генотипом CC (n = 10) имели более низкую флуоресценцию родамина (51,1±11,4%) по сравнению с клетками CD56+ от индивидуумов с генотипом TT (n = 11) (67,5±9,5%), показывающую, что клетки из носителей CC имеют более высокую P-gp активность по сравнению с клетками, взятыми у носителей TT.

Помимо исследований *in vitro*, которые подтвердили экспрессию P-gp и функциональную последовательность полиморфизма C3435T, осуществлялись клинические фармакокинетические исследования для изучения клинической относительности этой мутации в гене MDR1 [35]. Были определены концентрации дигоксина в плазме и моче и фармакокинетические параметры, включая AUC, биобиодоступность, *Tmax*, *Cmax*, почечный клиренс, и периоды полувыведения, которые были вычислены или получены как производные. Индивидуумы с генотипом CC (n = 3) имели более высокую дуоденальную P-gp экспрессию и более низкие значения дигоксина AUC после предварительного приема рифампина в сравнении с волонтерами, которые были гомозиготны по генотипу TT [37]. Гетерозиготные имели промежуточные уровни дуоденальной экспрессии P-gp и значений AUC.

Одной из надежд на оптимизацию эффективности и цитотоксичного лечения является *концепция индивидуализированной фармакотерапии* [14, 24, 29, 42]. Термин означает индивидуальный подбор лекарств и доз

в соответствии с предварительными анализами природного генетического полиморфизма, влияющего на транспорт лекарств и метаболизм [3]. В этом контексте, ген MDR1, обеспечивающий множественную устойчивость, известный как ABCB1 (аденозин-трифосфат-связующая кассета подсемьи B транспортер-1), является одним из наиболее интересных кандидатов для фармакогенетических исследований [32]. Расшифровка MDR1 аденозин-трифосфат-связующей кассеты (ABC) транспортера P-gp имеет сходство с широким рядом широко используемых лекарств [1].

Активность P-gp является важным фактором для определения фармакокинетики субстрата *P-gp лекарств* в соответствии с широкой экспрессией протеина в нормальном тканевом «барьере», таком, как гастроинтестинальный и почечный эпителий [1]. В настоящее время число *простых нуклеотидных полиморфизмов* (SNP) идентифицировано в MDR1, включая «*тихий*» *полиморфизм* C3435T в экзоне 26, связанном с измененной экспрессией и функцией P-gp [8]. Более низкая экспрессия и функция P-gp наблюдалась *in vivo* у носителей T-аллели по сравнению с диким типом CC гомозигот [8]. Многие последующие исследования продемонстрировали важные функциональные, кинетические и прогнозные последовательности этой SNP для фармакомоделирования [4, 7, 13].




Ключевые ферменты и «суицидные» субстраты для лекарств

Активация и инактивация ключевых ферментов промежуточного метаболизма, называемые *взаимопревращениями*, находятся под разнообразным контролем, в том числе гормональным, иммунохимическим и генетическим. Взаимопревращения в архиважной системе жизнедеятельности гликоген-фосфорилазы, были установлены рентгеноструктурным анализом. Фермент представляет собой *димер* с симметрией второго порядка. Каждая субъединица имеет активный центр, который расположен внутри белка и в *b-форме* плохо доступен для субстрата. Действие АМФ и конформационные изменения в активных центрах приводят к возникновению более активной *a-формы*. После удаления фосфатных остатков фермент самопроизвольно принимает исходную *b-конформацию*.

Аллостерической регуляции принадлежит большая роль в реализации кинетических процессов. Одним из примеров аллостерической регуляции является ключевой фермент биосинтеза пиримидинов – *аспартат-карбамоилтрансфераза* (*АКТ-аза*). Аллостерические эф-

фекты опосредуются субстратом или ингибиторами и *аллостерическими эффекторами*, которые вызывают конформационные изменения белка и изменяют его активность. Субъединицы АКТ-азы состоят из двух доменов независимых структурных фрагментов. N-концевой домен регуляторной субъединицы способствует взаимодействию с ЦТФ или АТФ. Zn^{2+}-содержащий второй домен контактирует со смежной каталитической субъединицей. Между *доменами* каталитической субъединицы расположен *активный центр*, в котором и происходит реакция с субстратом. Аллостерические ферменты, в отличие от изостерических (нормальных) ферментов, имеют S-образную кривую насыщения субстратом. В аллостерических системах сродство фермента к субстрату зависит от концентрации субстрата, и вместо константы Михаэлиса K_m сигмоидный характер кривой описывается коэффициентом Хилла *h*. Для изостерических ферментов значения $h = 1$, а при росте сигмоидности $h > 1$.




Все пути обмена веществ находятся под постоянным генетическим контролем, что обеспечивает баланс в обмене веществ, который определяется прежде всего активностью ферментов. Воздействие на тот или иной путь достигается регулированием активности ключевых ферментов, катализирующих наиболее медленную стадию метаболических путей. Активность ключевого фермента регулируется на трех независимых уровнях. Контроль за биосинтезом фермента осуществляется на генетическом уровне за счет синтеза соответствующей мРНК.

NB! В процессе *регуляции транскрипции* кодирующего фермента принимают участие *регуляторные белки* факторов транскрипции, действие которых направлено непосредственно на ДНК.

В генах имеются *промоторы* – специальные регуляторные участки и участки связывания регуляторных белковых элементов. На эффективность действия этих белков влияют метаболиты или гормоны, которые вызывают как индукцию, так и репрессию, как их самих, так и лекарств.

Быстрее с участием АТФ, фосфатазы и протеинкиназы действует механизм взаимопревращения ключевых ферментов, когда по сигналу извне и при участии вторичного мессенджера *активирующий фермент* (E_1) переводит ключевой фермент в каталитически активную форму. А когда потребность в этом пути обмена веществ отпадает, *инактивирующий фермент* (E_2) снова переводит ключевой фермент в неактивную форму. Активность ключевого фермента может регулироваться *лигандом*, в качестве которого выступает субстраты, катаболиты, коферменты, лекарства и иные эффекторы. Иногда лиганд, как *аллостерический эффектор*, действует путем связывания в активном центре или в другом

месте фермента. Ингибирование ключевого фермента идет *по типу обратной связи* или метаболитом, участвующим в другом пути. Стимулируют и ингибируют ферменты реагенты реакционной цепи. При моделировании явлений генополиморфизма в метаболических процессах следует учитывать, что многие коферменты участвуют в активации менее реакционноспособного промежуточного соединения, которое за счет экзоэргической реакции переносится на другую молекулу. АТФ и другие *нуклеозидтрифосфатные коферменты* могут переносить не только фосфатные остатки, но и участвовать также в реакциях активации с нуклеозидами или нуклеотидами.

Наш многолетний интерес к пиримидинам [31] объясняется следующим примером. Фосфорилирование свободной глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата и изомеризации в глюкозо-1-фосфат по реакции с уридинтрифосфатом образуется УДФ-глюкоза, у которой аномерная ОН-группа при атоме С1 углевода связана с фосфатом, Эта «богатая энергией» связь (ацеталь-фосфат) делает возможным экзоэргический перенос остатков глюкозы на гликоген, крахмал или другие акцепторы.




По ранее описанному принципу активируется *аминоспирт холин* для встраивания его в фосфолипид. *Холин* прежде всего фосфорилируется АТФ в *холинфосфат*, который с отщеплением от дифосфата переходит в *ЦДФ-холин*, а затем холинфосфат образует с диацилглицерином фосфатидилхолин (лецитин).

Ингибиторами ферментов являются многие *лекарства*. *Метаболиты* также могут быть ингибиторами ферментов в процессах регуляции. Большинство ингибиторов ферментов действуют обратимо. Однако существуют также *необратимые* ингибиторы ферментов, которые модифицируют целевой фермент. Принцип действия ингибитора и *тип его ингибирования* определяют путем сравнения кинетики реакции в присутствии ингибитора и без него. Различают *конкурентное* и *неконкурентное* ингибирование, а в некоторых случаях действует *аллостерическое ингибирование*.

NB! Некоторые субстратные аналоги, содержат дополнительные реакционные группы так называемых «*суицидных субстратов*».

Ингибирование такими соединениями проявляется как *неконкурентное*, так как вначале они связываются обратимо, а затем образуют ковалентное соединение с активным центром фермента. К ним принадлежит гораздо большее число лекарств и ксенобиотиков, чем это представляется сейчас [24, 25, 27]. Вслед за В. Паули, можно подчеркнуть, что молекулы могут быть похожими или разными, полезными или вредными, покоящимися или сверхбыстрыми, уже известными или вновь создаваемыми, но в силу *дихотомизации* все эти качества могут соединяться.

NB! Многие лекарства и ксенобиотики действуют по принципу «суицидного» взаимодействия: очень нежно «обнимают» фермент, а затем «удушают» его в «дружеских» объятиях.

Так, например, действуют фосфорорганические соединения в диапазоне – от лекарств до мощнейшего химического оружия. Это еще один важный путь поиска истины в направлении расшифровки процессов биотрансформации лекарств и фармакомоделирования.

Ферменты первой линии обороны

Целый ряд направлений биомоделирования основывается на исследованиях *генетического полиморфизма фенотипов* человека, связанных с вопросами медико-биологического характера при установлении генетической компоненты в предрасположенности индивидов к определенным заболеваниям и чувствительности к лекарствам.

В последние годы сложилось более оптимальное определение этих процессов, называемое *фармакогенополиморфизмом* или генетическим полиморфизмом лекарств. Оно относится в большей степени к описанию явлений лекарственного метаболизма в различных этнических группах и популяциях, но все чаще и у отдельных индивидуумов.




Ферменты, метаболизирующие ксенобиотики, располагаются на мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭР) печени и других органов и тканей. При гомогенизации и функционировании клетки, мембраны преобразуются в везикулы или гранулы, называемые *микросомами*. Микросомы сохраняют большинство морфологических и функциональных характеристик интактных мембран ЭР, включая свойство шероховатости (у рибосомальных) или гладкости (у нерибосомальных) поверхности ЭР. В то время как рибосомальные микросомы связаны с синтезом белка, нерибосомальные богаты ферментами, ответственными за окислительный метаболизм ксенобиотиков.

NB! На первом этапе нейтрализации смертельно опасных для организма ксенобиотиков, многих лекарств и эндогенных веществ, а иначе в *первой фазе* биотрансформации, менее реакционноспособные соединения подвергаются ферментативному гидроксилированию.

Такая модификация делает возможной последующую конъюгацию с полярным веществом. Гидроксилирующие ферменты включают в качестве кофермента железосодержащий *гем*, который связывает оксид углерода. Биоэволюционные исследования говорят, что цитохромы терминального окисления, в том числе и гемопротеины, появились в живых организмах около 3,5 миллиардов лет назад. В восстановленной форме гемопротеины связывают монооксид углерода с образованием



комплекса с максимальным поглощением света при длине волны *450 нм*, вследствие чего появилось название «*цитохромы Р-450*», или *CYP*.

В *геме* цитохрома Р-450 железо связано не только с атомами азота четырех лигандов, образуя порфириновое кольцо, но и имеет пятый и шестой лиганд, сверху и снизу кольца гема, представляющие собой атом азота, гистидина и атом серы цистеина, входящие в состав полипептидной цепи белковой части цитохрома Р-450 [7].

CYP обнаруживается в кишечнике, почках, легких, надпочечниках, головном мозге, коже, плаценте, миокарде, но наибольшее количество CYP находится в гепатоцитах. Важнейшим свойством CYP является способность метаболизировать все химические соединения [8]. CYP относят к монооксигеназам, поскольку включают лишь один атом кислорода в субстрат. В отличие от диоксидаз, которые включают оба атома кислорода в субстрат, для семейства CYP наиболее важной реакцией является гидроксилирование. Система CYP участвует в обмене эйкозаноидов, в образовании ненасыщенных жирных кислот и других путях метаболизма. Эти группы ферментов известны как *оксидазы со смешанной функцией* или *монооксигеназы*. Активность этих ферментов зависит от восстанавливающего агента (НАДФ-Н) и молекулярного

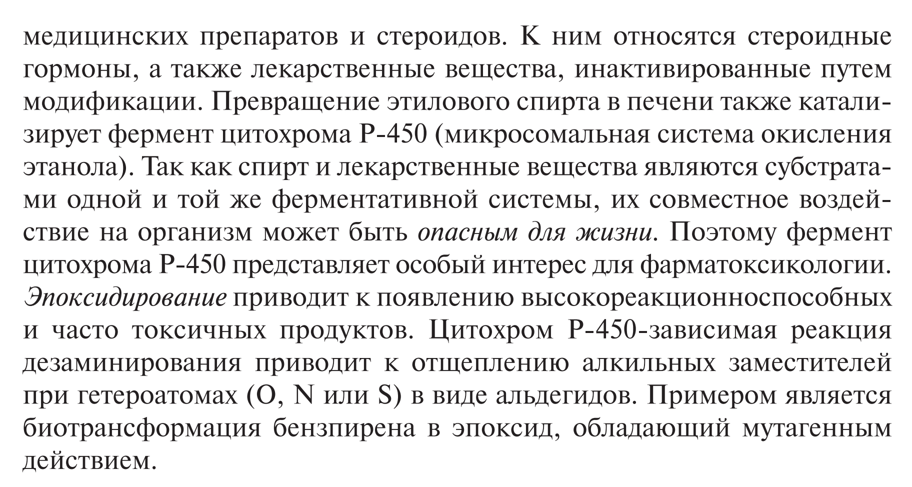



кислорода. В ходе реакции восстанавливается одна молекула кислорода на молекулу субстрата, при этом один кислородный атом включается в субстрат, а другой образует молекулу воды. Ключевую роль в этом окислительно-восстановительном цикле играют два микросомальных фермента:

- ✓ *флавопротеин НАДФ-Н-цитохром Р-450-редуктаза*, один моль которого содержит по одному молю флавинмононуклеотида (ФАН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД). Цитохром С является в этом цикле акцептором электрона, поэтому ферментную систему правильнее обозначить как НАДФ-цитохром С-редуктаза;
- ✓ ферменты *гемопротеина* или *цитохрома Р-450*, выполняют роль конечной оксидазы, а микросомальные мембраны содержат множество форм их ферментов возрастающих при повторном введении ксенобиотиков и отъявленных токсинов.

Далее мы рассмотрим результаты неудачной попытки отравления царя Митридата. Неудача была связана с относительным изобилием цитохрома Р-450, по сравнению с редуктазой печени, автоматически превращающей функции цитохрома Р-450 в лимитирующую стадию терминального окисления ксенобиотиков.

Из множества цитохром Р-450-зависимых реакций здесь приводится только несколько примеров. *Гидроксилирование* ароматического кольца играет центральную роль в метаболических превращениях



медицинских препаратов и стероидов. К ним относятся стероидные гормоны, а также лекарственные вещества, инактивированные путем модификации. Превращение этилового спирта в печени также катализирует фермент цитохрома Р-450 (микросомальная система окисления этанола). Так как спирт и лекарственные вещества являются субстратами одной и той же ферментативной системы, их совместное воздействие на организм может быть *опасным для жизни*. Поэтому фермент цитохрома Р-450 представляет особый интерес для фарматоксикологии. *Эпоксидирование* приводит к появлению высокореакционноспособных и часто токсичных продуктов. Цитохром Р-450-зависимая реакция дезаминирования приводит к отщеплению алкильных заместителей при гетероатомах (O, N или S) в виде альдегидов. Примером является биотрансформация бензпирена в эпоксид, обладающий мутагенным действием.

Свойства CYP-семейств




Цитохром Р-450, в литературе часто обозначаемый CYP, представляет собой группу ферментов, которые осуществляют не только метаболизм лекарственных средств и ксенобиотиков, но и участвуют в синтезе стероидных гормонов, холестерина, желчных кислот, простаноидов (тромбоксана A_2, простациклина I_2) [7, 29]. Впервые цитохром Р-450 идентифицировали Klingenberg и Garfincell в микросомах печени крысы в 1958 году.

Система CYP имеет более 1000 изоформ – изоферментов. Изоферменты CYP подразделяются на семейства и подсемейства. При этом изоферменты с идентичностью аминокислот более 40% объединены в семейства (всего выделено 36 семейств, 12 – у млекопитающих), изоферменты с идентичностью аминокислот более 55% объединены в подсемейства (выделено 39 семейств) (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Основные свойства семейств цитохрома Р-450 или CYP

Семейство	Участие в биохимических процессах	Количество подсемейств	Количество генов
CYPI	Метаболизм преимущественно полициклических ароматических углеводородов	2	3 гена
CYPII	Метаболизм стероидов	12	17 генов 11 псевдогенов
CYPIII	Метаболизм разных ксенобиотиков и лекарственных средств	1	4 гена 2 псевдогена



Таблица 3.1 (окончание)

Семейство	Участие в биохимических процессах	Количество подсемейств	Количество генов
CYPIV	Метаболизм арахидоновой, линолевой и других жирных кислот	5	11 генов 7 псевдогенов
CYPV	Синтез тромбоксана A_2	1	1 ген
CYPVIIA	7-α-гидроксилирование стероидного ядра	1	Изучается
CYPVIIB	7-α-гидроксилирование в головном мозге человека и животных	1	Изучается
CYPIIIA	Синтез простациклина I_2	1	Изучается
CYPIIIB	Биоситез желчных кислот	1	Изучается
CYPXI	Биосинтез стероидов	2	3 гена
CYPXVII	Биосинтез стероидов и обеспечение 17-α-гидроксилирования	1	1 ген
CYPXIX	Ароматизация эстрогенов в биосинтезе стероидов	1	1 ген
CYPXXI	Участие в биосинтезе стероидов	1	1 ген 1 псевдоген
CYPXXIV	Деградация витамина D	1	1 ген
CYPXXVIA	Гидроксилирование ретиноевой кислоты	1	Изучается
CYPXXVIB	Гидроксилирование ретиноевой кислоты	1	Изучается
CYPXXVIIA	Биосинтез желчных кислот	1	Изучается
CYPXXVIIB	1-α- гидроксилирование витамина D_3	1	Изучается
CYPXXVIIC	Роль не установлена	1	Изучается
CYPXXXIX	Роль не установлена	1	Изучается
CYPXXXVI	24-гидроксилирование холестерина	1	Изучается
CYPXXXXXI	14-α-диметилирование ланостерола, биосинтез холестерина	1	1 ген 2 псевдогена




Семейства CYP принято обозначать римскими цифрами, подсемейства – римскими цифрами и латинской буквой. Изоферменты цитохрома Р-450 обозначаются арабской цифрой, обозначающей CYP семейство латинской буквой, обозначающей подсемейство, арабской цифрой, соответствующей изоферменту [8, 29].

Параметры выбора экспериментальных моделей для изучения активности CYP-изоферментов под действием различных факторов основываются на гомологии аминокислотной последовательности между человеком и различными видами животных (табл. 3.2).

Таблица 3.2



Сравнительная экстраполяционная гомология изоферментов CYP у различных животных по отношению к человеку

Изофермент	Человек, %	Мини-свинья, %	Обезьяна, %	Собака, %	Кролик, %	Хомяк, %	Крыса, %	Мышь, %
CYP1A1	100	92	90	83	77	78	79	78
CYP1A2	100	89	88	82	79	74	75	73
CYP2C9	100	88	79	68	76	78	74	72
CYP2C19	100	87	81	80	74	71	72	69
CYP2D6	100	91	89	75	72	73	76	70
CYP2E1	100	88	86	81	79	79	79	77
CYP3A4	100	90	85	78	73	69	70	74

Наибольшей экстраполяционной гомологией к человеку по аминокислотному составу CYP-изоферментов обладают мини-свиньи и приматы. Хотя большинство исследований проводится на крысах и кроликах, изучение аминокислотной последовательности CYP изоферментов на крупных животных имеет не только чисто экспериментальное значение, но и является базисом для экспертизы новых лекарств, а также для доклинических исследований взаимодействия лекарств и ксенобиотиков, оценке биотрансформации и биоэквивалентности.





«Яростные» реакции «немых» рецепторов

Известно, что *бутирилхолинэстераза* осуществляет гидролиз ацетилхолина, а также катализирует реакцию гидролиза деполяризующего миорелаксанта суксаметония (дитилин, сукцинилдихолин). Установлены аминокислотная последовательность и 602 аминокислотных остатков, входящие в состав бутирилхолинэстеразы. Ее молекулярная масса 68 кДа. Идентифицирован ген бутирилхолинэстеразы, находящийся в 3-й хромосоме, локусе 3q26.1-q26.2. Кроме эритроцитов бутирилхолинэстераза обнаруживается во всех клетках. Особенно большое количество фермента определяется в эмбриональной ткани головного мозга, а также при ганглиобластоме, нейробластоме, менингиоме [5, 7, 15].

Неспецифическими акцепторами ацетилхолина называют молекулярные структуры, способные связывать ацетилхолин, холиномиметические, холинолитические и антихолиноэстеразные вещества, имеющие структурное сходство с ацетилхолином. Следствием этого



взаимодействия оказывается удаление соответствующего холинергетического вещества из кровотока. Акцепторы называют также «*немыми*» или *молчащими рецепторами* (silent receptors), местами потери ацетилхолина (sites of loss) или где он может депонироваться, «откладываться про запас» (sites of storage). Роль неспецифических холинорецепторов состоит, по-видимому, в том, чтобы захватывать всякое попавшее в кровь, чужеродное вещество, которое по своему строению напоминает ацетилхолин [10].

Можно провести параллель по генополиморфизму между неспецифическими холинорецепторами и неспецифическими холинэстеразами, хотя допустимо в отношении и специфической холинэстеразы эритроцитов, роль которых состоит в нейтрализации в крови веществ, которые могли бы нейтрализовать специфическую холинэстеразу в синапсах.

NB! Неспецифические холинэргические механизмы выработались в процессе эволюции для защиты синапсов от ацетилхолиноподобных веществ, поступающих в организм. Это протекторная система, участвующая в общих детоксицирующих процессах и обезвреживании ксенобиотиков в печени и иных органах.




Депонирование имеет, по-видимому, еще большее значение для миорелаксантов кратковременного действия, которые вообще не гидролизируются холинэстеразами. На кролике эффективная кураризующая доза препарата 1815 IS (LVII) уменьшается в 18 раз после предварительной инъекции SKF. Чем короче эффект миорелаксанта, тем сильнее сказывается потенцирующее действие SKF, эффект бензохинония потенцируется незначительно (в 1,6 раза), эффект тубокурарина – в 3,3 раза, галламина (флакседила) – в 3,7 раза, дитилина – в 5 раз, декметония – в 7,5 раз, а препарата 1815 IS (LVII) – в 18 раз [10].

Значение неспецифических холинорецепторов может, по-видимому, сильно варьировать в зависимости от разных факторов: от строения холинергического вещества, от вида и генотипа животного, определяющих причины различий в чувствительности разных видов животных к миорелаксантам и другим холинотропным средствам (рис. 3.9) [5, 10].

Бутирилхолинэстеразу со сниженной активностью считают *атипичной псевдохолинэстеразой*. Описаны случаи продолжительной остановки дыхания (апноэ) при применении суксаметония – вместо 2-3 минут апноэ у лиц с парадоксальной реакцией продолжалась 2 часа и более [10]. Аутосомное рецессивное моногенное наследование низкой активности бутирилхолинэстеразы доказано рядом работ. Наши исследования, проведенные с помощью ПЦР, выявили мутации гена бутирилхолинэстеразы, причем повышенная чувствительность к суксаметонию наблюдается только у гомозигот. Синтез бутирилхолинэстеразы со



сниженной активностью связан с заменой в нуклеотидной последовательности в 209-м положении аденина на гуанин, представляющей наиболее распространенную мутацию.

Частота гетерозигот и гомозигот по всем мутантным аллелям, которые определяют сниженную активность бутирилхолинэстеразы [3, 7], представлена в табл. 3.3.

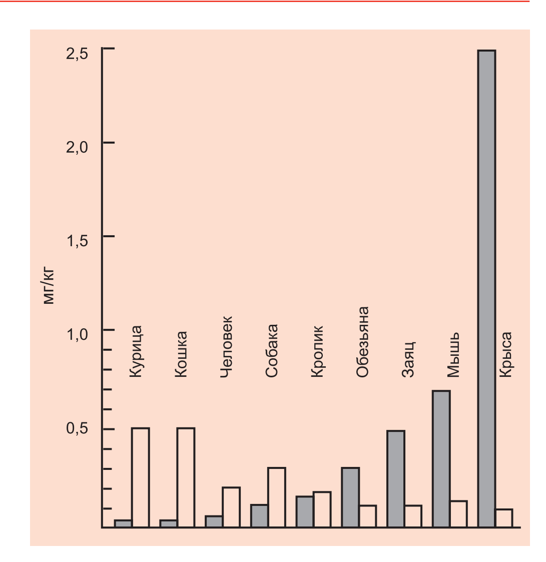


Рис. 3.9 Генополиморфизм разных видов животных в реакциях на миорелаксанты деполяризующего (дитилин, заштрихованные столбики) и недеполяризующего (тубукурарин, светлые столбики) действия. По оси ординат – доза (мг/кг), вызывающая 90-100% паралич (для мышей – ED_{50} при определении рефлекса поддержания позы)

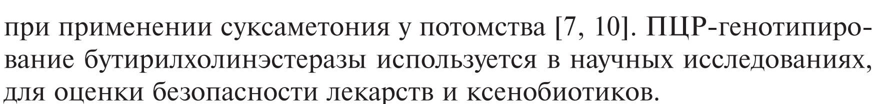



Фенотипирование сниженной активности бутирилхолинэстеразы основано на подавлении ее активности дибукаином в стандартных условиях. У животных и людей с нормальной активностью бутирилхолинэстеразы дибукаиновое число, которое представляет собой степень подавления фермента, выраженную в процентах, равно 80%. У гомозигот по мутантным аллелям, которые определяют сниженную активность бутирилхолинэстеразы, дибукаиновое число равно 20%, у гетерозигот по этим аллелям – 60%. *Дибукаиновый* тест позволяет проводить экстраполяцию между человеком и животными не только у гомозигот, но и у гетерозигот, что важно для профилактики осложнений

Таблица 3.3

Частота гетерозигот и гомозигот со сниженной активностью бутирилхолинэстеразы по мутантным аллелям

Популяция	Гетерозиготы, %	Гомозиготы %
Европейцы	2–4	1:2500
Чехи и словаки	7	1:400
Евреи Ирана и Ирака	10	1:400
Арабы	9	1:350



при применении суксаметония у потомства [7, 10]. ПЦР-генотипирование бутирилхолинэстеразы используется в научных исследованиях, для оценки безопасности лекарств и ксенобиотиков.

Подтверждение значимости дибукаинового теста мы получили в собственных исследованиях на гомозиготных крысах линии August с вживленными в мозг электродами.

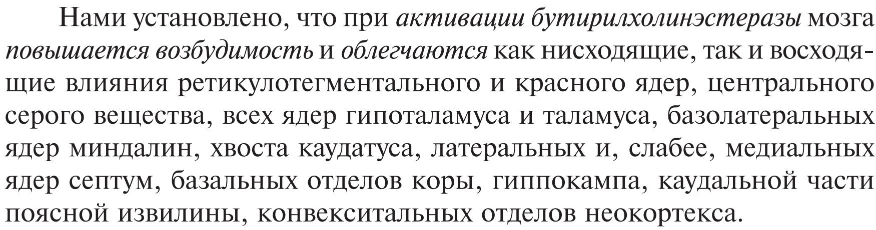
Накопление эндогенного ацетилхолина в мозгу после введения им физостигмина, галантамина или нивалина вызывает повышение порогов моторных и вегето-моторных реакций, вызванных стимуляцией прореальной, сигмовидных и супрасильвиевых извилин с частотой 5 имп/с, не влияет на протекание реакций, вызванных электрораздражителем с частотой в 15-20 имп/с, и, не изменяя порогов моторных компонентов реакций, вызванных частотой 100-250 имп/с, определенным образом повышает пороги их вегето-моторных компонентов [6].




Не останавливаясь на феноменологической стороне этого вопроса, следует сказать, что эндогенный ацетилхолин снижает пороги моторных и вегето-моторных компонентов поведенческих реакций, вызванных стимуляцией ядер гипоталамуса и стриопаллидума с частотой 5-10 имп/с. Эндогенный ацетилхолин снижает пороги экспрессивных компонентов, вызванных стимуляцией гипоталамуса с частотой 20-100 имп/с, и в разной степени повышает пороги иных «гипоталамических» реакций. Следует подчеркнуть общность действия эндогенного ацетилхолина на эмоциональные реакции и их компоненты, получаемые при стимуляции гипоталамуса и центрального серого вещества [6].

NB! Каждая нейромедиаторная система может иметь не только несколько выходов в моторные, вегетативные, эндокринные системы организма, но и конвергировать на мультимедиаторные нейроны, от чего и будет зависеть конечный характер реакций, вызываемых искусственным возбуждением.

В доказательство нашего предположения можно привести два примера: *реакция ярости* вызывается при *электрической стимуляции* лишь определенных мозговых структур (гипоталамус, миндалины, центральное серое вещество), причем их суммарная реакция различна. *Инъекции ацетилхолина* вызывают более примитивные по организации *реакции ярости*, но с гораздо большего числа структур; вещества, избирательно блокирующие монорецепторы (атропин, ганглерон) наилучшим образом устраняют реакцию, вызванную агонистом *ацетилхолином*, но *не электростимуляцией*. С другой стороны, те или иные антагонисты медиатора, не устраняя целиком результаты электростимуляции, значительно обесцвечивают поведенческую реализацию, лишают ее ряда экспрессивных компонентов.



Нами установлено, что при *активации бутирилхолинэстеразы* мозга *повышается возбудимость* и *облегчаются* как нисходящие, так и восходящие влияния ретикулотегментального и красного ядер, центрального серого вещества, всех ядер гипоталамуса и таламуса, базолатеральных ядер миндалин, хвоста каудатуса, латеральных и, слабее, медиальных ядер септум, базальных отделов коры, гиппокампа, каудальной части поясной извилины, конвекситальных отделов неокортекса.

Возбуждение *холинорецепторов* при одновременной блокаде дибукаином бутирилхолинэстеразы вызывает *угнетение* вышеперечисленных и ростральных частей миндалин, скорлупы, головки каудатуса, рострума поясной извилины. Облегчающее действие через ацетилхолин оказывает в черной субстанции, каудальной части ретикулотегментального ядра, переднем гипоталамусе, бледном шаре, дорзомедиальных ядрах миндалин.

NB! Приведенные факты показывают, что бутирилхолинэстераза и «немые» рецепторы играют немаловажную роль в развитии ярости, процессах интрацентральной регуляции мозга и вариациях психики.




Нарушения психики особенно заметны при болезни Альцгеймера. Сравнительно недавно идентифицирована мутация гена бутирилхолинэстеразы, названная *К-вариантом*. Она связана с заменой в нуклеотидной последовательности в положении 1615 гуанина на аденин, в результате которого возникает фермент, в котором в 539-м положении аланин заменен на треонин [11]. Активность такого фермента снижена на 30%. Распространенность гомозигот по *К-варианту* составляет от 1% до 0,76%, при этом у людей, имеющих гомозиготы по *К-варианту*, в 2,1 раза чаще встречается болезнь Альцгеймера. Поэтому возможно использование гомозигот по К-варианту как в качестве маркеров и тестовых основ биомоделирования этого тяжелого и пока малоизученного заболевания, так и при анализе системной деятельности мозга.

Мимикрии пиримидинов

Дигидропириминидин дигидрогеназа (ДПДГ) является ферментом, обеспечивающим восстановление *урацила* и *тимидина* в первой фазе реакции трехэтапного метаболизма этих соединений до β-аланина. ДПДГ метаболизирует 5-фторурацил, бромпиримин, йодпиримин, триметидон и другие пиримидины, применяемые в терапии онкологических, вирусных, бактериальных и иммунодефицитных заболеваний. Аминокислотная последовательность и количество аминокислотных остатков, входящих в состав ДПДГ – 1025, ее молекулярная масса – 111 кДа, идентифицирован ген ДПДГ, находящийся в 1-й хромосоме,



локусе 1p22. ДПДГ локализуется в клетках печени, моноцитах, лимфоцитах, гранулоцитах, тромбоцитах, (но не в эритроцитах), в цитоплазме клеток различных тканей и органов [40]. Осложнения, возникающие при применении пиримидинов (стоматит, лейкопения, тромбоцитопения, аллопеция, лихорадка, снижение веса, диарея, мозжечковая атаксия, сопор и др.), сопровождаются у некоторых больных высокими концентрациями в моче урацила и тимидина, а в крови – метаболитов пиримидина. По-видимому, причиной развития осложнений при лечении пиримидинами является наследственная низкая активность ДПДГ [23]. Было показано, что низкая активность ДПДГ наследуется по аутосомному рециссивному типу. Кроме того, была изучена фармакокинетика 5-фторурацила после его однократного применения у больной, ранее перенесшей серьезные осложнения длительной терапии этим препаратом. Был отмечен удлиненный период полувыведения препарата – 159 минут, при нормальном периоде полувыведения 8-22 минуты.

Внутриклеточные нуклеотиды пиримидина могут синтезироваться *de novo* из глутамина, CO_2, АТФ (аденозин-5'-трифосфат) или они могут быть образованы из ранее сформированных нуклеозидов пиримидина. Противопролиферативные и иммуносупрессорные виды деятельности *бреквинарного натрия* (*BQR*), как полагают, имеют место благодаря торможению активности дигидрооротатной дигидрогеназы, что приводит к подавлению синтеза пиримидина *de novo*. Рассмотрим воздействие уридина, нуклеозида пиримидина, на противопролиферативную и иммуносупрессорную активность BQR.



NB! Снижение уровней пиримидинов в искусственной среде в клетках Т, стимулированных Con A и торможение пролиферации клеток низкими концентрациями BQR(< или = 65 мкМ) обращаются *уридином* [30, 31].

Тем не менее, уридин не может обратить воздействие BQR в высокой концентрации(> или = 65 мкМ). Способность BQR вызывать анемию у мышей BALB/c предотвращается параллельным введением уридина. В отличие от этого иммуносупрессорная активность BQR не подвергается воздействию таких же доз уридина [3, 31].

Дигидрооротатная дигидрогеназа (*DHODH*) катализирует четвертый совершенный шаг в биосинтезе *de novo* пиримидинов. Коль скоро пролифирирующие Т клетки человека имеют исключительную потребность в биосинтезе *de novo* пиримидинов, ингибиторы DHODH малых молекул представляют привлекательный терапевтический подход к аутоиммунным заболеваниям, иммуноподавлению и раку. Структура DHODH человека и родственных ей соединений пока неизвестны. Известно лишь, что высокорастворимые кристаллические



структуры DHODH человека в сочетании с двумя различными ингибиторами растворяются. Первичный набор фаз получен при использовании фазирования аномальной дифракции многоволновой длины с DHODH, содержащей *селенометионин*. Эти структуры очищались до кристаллографических факторов R 16,8% и 16,2% в растворах 1,6А и 1,8А для ингибиторов, относящихся к *бреквинару* и *лефлюномиду*, соответственно.

Установлено, что DHODH человека имеет два домена: α/β-полостной домен, содержащий активный центр, и α-спиральный домен, формирующий открытие туннеля, ведущего к активному центру. Оба ингибитора имеют в этом туннеле общий связующий центр, и различия в районе связывания управляют чувствительностью или сопротивляемостью лекарства. Активный центр DHODH человека в целом подобен ранее описанному бактериальному активному центру. Самые большие различия между ними заключаются в том, что каталитическая основа, устраняющая протон из дигидрооротата, является в большей степени серином, чем цистеином, а также в том, что уплотнение флавиннуклеотида в его связующем центре крепче.



NB! Нами показано, что *6-алкилпиримидинон* вызывает у грызунов изменения уровней интерферона. В то же время 6-арилпиримидиноны обладают значительно большими возможностями и являются противовирусными агентами с ярко выраженной активностью.



Лучшим примером 6-арилпиримидинонов является аналог ABPP (2-амино-5-бромо-6-фенил-4,3Н-пиримидинон), иначе известный как *бропиримин* [3]. Этот агент, синтезированный для нас в НИИФОХ РГУ, в лабораторных исследованиях продемонстрировал ряд качеств, характеризующих его как *иммуномодулятор*. Кроме того, он демонстрирует эффективность в различных противоинфекционных и противоопухолевых лабораторных моделях. Сейчас он исследуется в клинических условиях на предмет его использования для лечения рака.

Корреляция структурной активности проводилась в условиях живого организма при оценке антивирусной активности и индукции *интерферона* в качестве конечных целей. Структурные изменения вокруг кольца пиримидина от первой до шестой позиции показали, что толерантность к антивирусной активности сильнее ограничивалась в позициях с первой по четвертую (то есть, любая замена снижала активность), тогда как значительное структурное изменение допускалось в пятой и шестой позициях. Таким образом, различные галогены и алкиловые группы с низким молекулярным весом допускались в пятой позиции, а некоторые алкиловые, ариловые и гетероциклические группы допускались в шестой позиции [3]. Некоторые из изученных нами

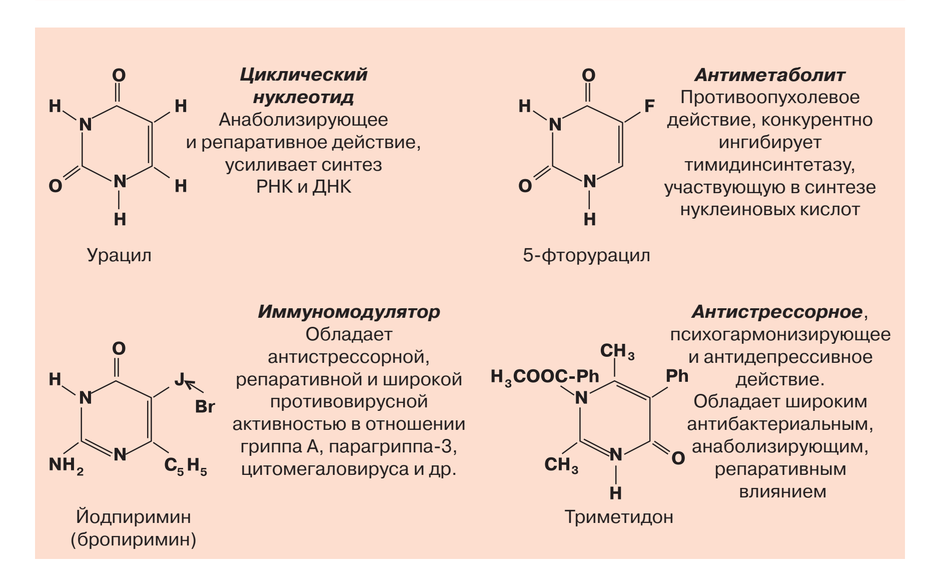


Рис. 3.10. Некоторые эффекты и области применения пиримидинов




наиболее активных составляющих включали *броминовый* или *йодиновый заменитель* в пятой позиции и *флюоро-замененный* или *метокси-замененный* фенил в шестой позиции (рис. 3.10).

При введении *бропиримина* имела место умеренная активация ксантиноксидазы, а также значительное повышение вызываемой интерфероном активности 2,5-А синтетазы при отличной взаимосвязи ответа на дозу с эффективностью. Это было основано на количестве поражений вирусов изолированных вагинальных гомогенатов. Так же эффективен был 2-процентный бропиримин при внутривагинальных инфекциях HSV-1 у морских свинок.

Цитомегаловирусная инфекция мышей аналогичным цитомегаловирусным инфекциям людей образом может принимать форму временного иммуноподавления или острой летальной инфекции. В модели с временным иммуноподавлением происходит снижение вызванной митогеном пролиферации и индукции ИЛ-2 клеток селезенки [30]. *Бропиримин отменял иммунноподавление*, характеризующееся снижением ответственности клеток селезенки на митогены. Установлено, что вся популяция клеток Т лучше отвечала на митогены после нескольких доз бропиримина, при этом нормализировался и коэффициент Тн/Ts. Оказывается, что клетки Т лучше отвечали на активацию благодаря выработке ИЛ-2 и усиленной экспрессии рецепторов ИЛ-2. Бропиримин также защищал мышей от угрозы летального цитомегаловируса [3, 30].

Все эти исследования проводились в условиях живого организма, тогда как подобных эффектов после оказания воздействия бропиримином на моноциты или лимфоциты в культуре не замечено.

NB! Первичные эффекторные клетки, активированные бропиримином – это макрофаги и клетки NK. Бропиримин может вызывать выработку α-интерферона, ИЛ-1 и ФНО-α. Он также усиливает количество рецепторов ИЛ-2 и поверхностных Ia [30].

У бропиримина обширный фармакологический профиль, включающий множество самых разных противовирусных и противоопухолевых реакций. Бропиримин продемонстрировал значительную профилактическую и терапевтическую активность против вирусных РНК и ДНК инфекций в животных моделях через различные пути введения [3].

Ошибка врагов Митридата или типы метаболизаторов

Межвидовые, внутривидовые и индивидуальные различия в скорости метаболизма ксенобиотиков позволяют выделить популяционные группы в зависимости от активности ферментов метаболизма [1, 2, 7]:




- ✓ EM-метаболизаторы (от extensive metabolism, другое название «экстенсивные» или «активные» метаболизаторы) – животные и люди со среднестатистической скоростью метаболизма определенных ксенобиотиков. Как правило, они гомозиготны по «дикому» аллелю гена соответствующего фермента. К EM-метаболизаторам относится большинство населения, а также видов и популяций животных;
- ✓ PM-метаболизаторы (от poor metabolism, другое название «медленные» метаболизаторы) – люди со сниженной скоростью метаболизма определенных ксенобиотиков, как правило, гомозиготы (при аутосомно-рецессивном типе наследования) или гетерозиготы (при аутосомно-доминантном типе наследования) по полиморфному «медленному» аллелю гена соответствующего фермента. У PM-метаболизаторов либо отсутствует синтез фермента метаболизма, либо происходит синтез «дефектного» фермента. Результатом этого является снижение ферментативной активности или ее отсутствие. У PM-метаболизаторов ксенобиотики накапливаются в организме в высоких концентрациях, что приводит к появлению выраженных нежелательных эффектов, вплоть до интоксикации.
- ✓ UM-метаболизаторы (от ultraextensive metabolism, другие названия «сверхактивные» или «быстрые» метаболизаторы), – лица с повышенной скоростью метаболизма, как правило, ксеногомозиготы (при аутосомно-доминантном типе наследования) по полиморф-



ному «быстрому» аллелю гена соответствующего фермента. Для «сверхактивных» метаболизаторов доза должна быть выше, чем для ксеноактивных метаболизаторов.

UM-метаболизаторы более устойчивы к ядам, нежели EM- и, тем более, PM-метаболизаторы. Прежде явления низкой чувствительности к ядам связывали с толерантностью. По преданию, пытаясь отравить царя Митридата, в его пищу длительное время добавляли малые дозы мышьяка, чем как мы теперь понимаем, инициировали активность CYP изоферментов.

NB! Когда царедворцы Митридата попытались убить царя гигантской дозой мышьяка, UM-метаболизатор, Митридат не только выжил, но и, презирая каноны биоэтики, велел декапитировать своих незадачливых оппонентов. Вот к чему приводит незнание и игнорирование фундаментальных основ биомедицины и фармакогеномики! Для некоторых оно может стать смертельно опасным.

С тех пор в фармакологии и медицине пониженная чувствительность к лекарственным препаратам и хорошая переносимость высоких доз токсических веществ получила название *митридатизм*.




Распространенность генотипов PM- и UM-метаболизаторов по отдельным ферментам метаболизма лекарственных средств в различных популяциях (этнических группах) представлена в табл. 3.4.

Таблица 3.4

Фенотипы PM-метаболизаторов («медленных») по ферментам метаболизма в различных популяциях и этнических группах

Субстраты ферментов метаболизма лекарств и ксенобиотиков	Ферменты метаболизма	Этнические группы	Частота
Сиофор, метформин, флувастатин, аценокумарол, большинство НПВС и селективных ингибиторов циклооксигеназы-2, изофлавоны, варфарин, фенитоин.	CYP2C9 изофермент подсемейства CYPIIC мефетоин-4-гидроксилазы цитохрома P-450	Русские (ЮФО) Европейцы Белое население США Афроамериканцы Китайцы	5% 1-3% 0,06% 0,05% 0,026%
Циметидин и др. H_2-гистаминоблокаторы, пароксетин, β-адреноблокаторы, антидепрессанты, нейролептики, транквилизаторы, пропафенон, пароксетин, табак (никотин, котинин, полициклические ароматические углеводороды), «экстази»	CYP2D6(не имеет индукторов) изофермент подсемейства CYP2D дебризохин метаболизатор цитохрома P-450	Жители Гонконга Европейцы Русские (Эстония) Русские (СЗФО) Белое население США Русские (ЮФО) Русские (Москва) Словаки Гренландцы Ненцы	25-30% 5-10% 7,8% 7% 6% 6% 4,5% 4% 3,2% 3%





Таблица 3.4 (продолжение)




Субстраты ферментов метаболизма лекарств и ксенобиотиков	Ферменты метаболизма	Этнические группы	Частота
Циметидин и др. H_2-гистаминоблокаторы, пароксетин, β-адреноблокаторы, антидепрессанты, нейролептики, транквилизаторы, пропафенон, пароксетин	CYP2D6(не имеет индукторов) изофермент подсемейства CYP2D дебризохин метаболизатор цитохрома Р-450	Афроамериканцы Эскимосы, наскапи (субарктические восточные индейцы) Египтяне Арабы, евреи Нигерийцы Ганийцы Китайцы Корейцы Японцы	3% 2% 1-4% 0,8-1% 0,7-1% 0,7-1% 0,6-1% 0,2-0,3% 0%
Табак (никотин, котинин, полициклические ароматические углеводороды), «экстази»	CYP2D6(не имеет индукторов) изофермент подсемейства CYP2D дебризохин метаболизатор цитохрома Р-450	Испанцы Европейцы Русские (СЗФО) Скандинавы	7% 5-7% 3,4% 1,5%
5-фторурацил, метилурацил, пентоксил, триметидон, бропиримин, йодпиримин	Дигидропиримидин, дигидрогеназавосстановление урацила до β-аланина	Корейцы Японцы	0,1% 0,01%
Изониазид, гидралазин, прокаинамид, сульфаниламиды, как глюкотропного, так и антибактериального действия	N-ацетилтрансфераза (цитозоль), обеспечивающая конъюгируемую эндогенную субстанцию ацетил-КоА	Египтяне Белое население США Афроамериканцы Индусы Русские (ЮФО) Европейцы Русские (Москва) Китайцы Наскапи (индейцы) Монголоиды Японцы Эскимосы	90% 60% 60% 59% 58% 50-58% 46% 22% 19% 10-15% 12% 10,5%
6-меркаптурин, 6-тиогуанин, 6-тиогуанина нуклеотид, азотиоприн,	Тиопурин S-метилтрансфераза-фермент катализа S-метилирования	Афроамериканцы Белое население США Европейцы Русские (СЗФО)	4,6% 4,3% 3,7% 3-3,5%
Ацетилхолин, суксаметоний, дитилин, сукцинилдихолин, дибукаин	Бутирилхолинэстераза-фермент, обеспечивающий гидролиз ацетилхолина и деполяризующих миорелаксантов	Белое североамериканское население Евреи Арабы Чехи Словаки Другие европейцы Русские (ЮФО)	0,001-0,0006% 10-12% 9-10% 6-8% 5-6% 2-4% 1-3%



Таблица 3.4 (окончание)

Субстраты ферментов метаболизма лекарств и ксенобиотиков	Ферменты метаболизма	Этнические группы	Частота
Этакриновая кислота, ацетаминофен, N-ацетилбензохинонимин, канцерогены	Глютатион SH-S-трансферазы (GST в цитозоле и микросомах)	Распространенность нулевых аллелей GSTM, GSTT и GSTP: Негроиды Ориенталы Кавказоиды	 ≥ 60% 36-52% 40-43%

Поскольку не всегда можно установить соответствие между генотипом и фенотипом по скорости метаболизма ксенобиотиков, иногда желательно сочетание методов фенотипирования и генотипирования. Именно комплексный подход обеспечивает возможность поиска адекватных животных-биомоделей для биомоделирования в отношении той или иной этнической группы населения и оценки влияния в ней ксенобиотиков и лекарств.




NB! Доказано, что носителям PM-аллелей (как гомозиготам, так и гетерозиготам) для предотвращения нежелательных эффектов требуется назначение препаратов-субстратов CYP2D6 в меньших дозах.

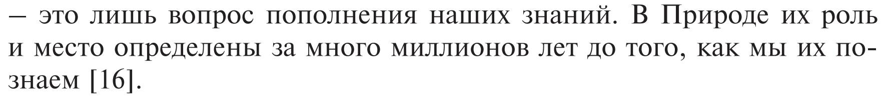
Кроме PM-метаболизаторов по CYP2D6, существуют и UM-метаболизаторы, распространенность которых в Европе составляет в среднем от 3,5 до 7%. UM-метаболизаторы являются носителями мутантного аллеля CYP2D6*2A, представляющего собой дубликацию гена CYP2D6. Эти мутации наследуются по аутосомно-рецессивному типу.

Среди «медленных» метаболизаторов по CYP2D6 в 2,5 раза чаще встречается болезнь Паркинсона, чаще развиваются рак мочевого пузыря, желудка, глотки, легких, первичный рак печени.

Системы генополиморфизма на скамейке запасных

Помимо хорошо изученных и генотипированных систем и ферментов метаболизма типа CYP, существуют достаточно обширные их сообщества, обеспечивающие воздействия лекарств и ксенобиотиков на организм и обладающие всеми признаками фармакогенополиморфизма. Мы определили в подзаголовке их место на «скамейке запасных» отнюдь не потому, что их значимость уступает системам цитохромов P-450, бутирилэстераз или ДПДГ. Это место им представлено в силу лишь меньшей изученности как их функциональной роли, так и нюансов генополиморфизма. Где каждому из них оказаться завтра

– это лишь вопрос пополнения наших знаний. В Природе их роль и место определены за много миллионов лет до того, как мы их познаем [16].



NB! Генетический полиморфизм ферментов, участвующих в метаболизме лекарств, является ответственным за измененный уровень и активность энзимов, а так же определяет риск неблагоприятных реакций на лекарственные препараты и возникновение некоторых видов рака.

В работе [17] исследовано 325 человек русского происхождения, которые были здоровыми людьми или пациентами, не имеющими злокачественных болезней. Работа включала полное исследование двух ферментов I фазы, CYP1A1 и CYP2D6, одного фермента II фазы, NAT 2. Проверены наиболее общие изменения NAT 2: 191G>A, 282C>T, 341 T>C, 590G>A, 803A>G, 857G>A и новое изменение 111T>C.





Определение генотипа восьми различных единичных нуклеотидных полиморфизмов гена NAT 2 предусматривает генотип, определяющий медленное ацетилирование 59,7% индивидов; 34,7% (29,6–40,2%) участников эксперимента оказались носителями, по меньшей мере, одной аллели, в которой кодируется способность к быстрому ацетилированию, и 5,6% (3,3–8,6%) обладают гомозиготными аллелями быстрого ацетилирования (неизмененная аллель *4 или измененная аллель *12A). Частотность изменений аллелей и генотипов фермента NAT 2 у русской группы были схожими с такими же показателями кавказской группы.

NB! Как и в других европейских группах, преобладание медленных ацетиляторов у русских людей явилось результатом высокой частотности *5 аллелей.

Изменение 191 G>A, характерное для темнокожего населения, не было зафиксировано в русской популяции.

Остановимся на характеристике некоторых значимых ферментных систем, обеспечивающих генетический полиморфизм человека.

Система трансферрина (Tf). Молекулярная масса трансферрина составляет 88000-90000. Трансферрин, или сидерофиллин, в соответствии с его фенотипическими особенностями относят к β_1-глобулинам сыворотки крови. Основными функциями трансферрина являются: трансформация достаточно токсичных для организма ионов Fe^{++} и Fe^{+++} в деионизированную форму; перенос железа к органам кроветворения, подавление бактериального роста в плазме лишением патогенных микроорганизмов железа; угнетение вирусного размножения.

Хотя большинство вариантов Tf, по-видимому, случайным образом распределяется в популяциях, тем не менее, при геногеографическом анализе обнаруживается определенная закономерность в локализации типов этого белка, главным образом в распределении $B_{0\text{-}1}$, B_2,D_{chi} и D_1.

Первый из них наиболее характерен для североазиатских монголоидов и американских индейцев, второй – для европеоидов, третий – для азиатских монголоидов, а последний – для африканских и маланезийцев. Так, наибольшая частота гена Tf^{c1} выявлена у негроидных групп, наименьшая – у монголоидов; популяции Европы в этом отношении занимают промежуточное положение. Столь же интересно распределение Tf^{c2}, частота которого увеличивается в ряду: монголоиды → европеоиды → негроиды.

В качестве примера приведем данные довольно занимательного исследования [18]. Некоторые народности африканского континента подвержены риску избытка железа вследствие его высокого содержания в национальных сортах пива. Были определены фенотипы трансферрина, проведено непрямое измерение статуса железа и концентрации лейкоцитарной аскорбиновой кислоты. Изучалась норма исчерпания L-аскорбиновой кислоты в сыворотке от различных фенотипов трансферрина. Показано, что частоты фенотипов трансферрина CC и CD у жителей Зимбабве были 0,893 и 0,107, соответственно. Статус железа трансферрина CC и CD был подобен. После изменения рецепта традиционного пива основная линия концентрации лейкоцитарного витамина C была существенно выше в 16 субъектах трансферрина CD ($x \pm$SE: 2,10±0,34 и 2,61±0,28 fmol/лейкоцит у мужчин и женщин, соответственно), чем у 134 субъектов трансферрина CC ($x \pm$SE: 1,65±0,11 и 1,99±0,11 fmol/лейкоцит у мужчин и женщин, соответственно; P = 0,024).




Пероральное применение аскорбиновой кислоты (2,0 г в день) приводило к более медленному повышению концентраций лейкоцитарного витамина C у субъектов с трансферрином фенотипа CD, чем у субъектов с трансферрином фенотипа CC (P = 0,028). После насыщения сыворотки *in vitro* 570 mмоль витамина C/L норма исчерпывания L-аскорбиновой кислоты была существенно ниже у субъектов с трансферрином фенотипа CD, чем у субъектов с трансферрином фенотипа CC [22]. Отсюда вытекает вывод о том, что полиморфизм трансферрина существенно влияет на статус витамина C у черных жителей. Чем не предпосылка для создания «этнических» лекарств?

Система альбумина (Al). Альбумин человека характеризуется наличием единственной полипептидной цепи с молекулярной массой 66000-69000, содержащей 33-37 половинных остатков компактного ядра, окруженного диффузной оболочкой со складчатой поверхностью. Для альбумина, по всей видимости, свойственно множество молекулярных вариантов, что частично обусловлено различной локализацией внутримолекулярных дисульфидных связей. Локус альбумина принадлежит к серии генетических локусов, наиболее изменчивых в

популяции человека [24]. На основании спектроскопии сывороточных белков обнаружено около 98 вариантов этого белка, а также не менее 35 уникальных аллоальбуминов. Наконец, отдельные формы альбумина в определенных этнических группах достигают полиморфных частот и поэтому получили соответствующее наименование.

Одновременно с типированием разновидностей трансферрина, группоспецифического компонента посттрансферрина учитывалась фенотипическая картина области альбумина. Исследование альбумина представляет специальный интерес после того, как стали известны полные сводки о полиморфизме по этой системе среди аборигенов Северной Америки. Оказалось, что альбумин «Наскапи» (*AlNa*) является распространенным вариантом среди восточных субарктических племен американских индейцев [32]. В племени наскапи он встретился с достаточно высокой полиморфной частотой (0,031), у аппачей резервации Сан-Карлос в Аризоне – с меньшей концентрацией, однако и здесь этот фактор оказался полиморфным (0,016). Тем не менее, у эскимосов Северной Америки и Гренландии не обнаружено генетических разновидностей этого белка [20]. Именно поэтому идентификация редких типов альбумина у чукчей и других народностей Северной Азии имеет важное значение для обнаружения генетических связей аборигенов Нового и Старого Света и их реакций на алкоголь и лекарства.




Система иммуноглобулинов (Gm). Молекула иммуноглобулина (Ig) состоит из одной пары соответственно идентичных тяжелых (H) и легких (L) цепей, соединяющихся между собой посредством дисульфидных связей. L-цепи имеют молекулярную массу около 23 000 дальтон; половина их имеет постоянную первичную структуру (C-часть), а другая половина – вариабельную (V-часть). Сходным образом построены и H-цепи, но в отличие от L-цепей они почти в два раза длиннее и тяжелее, около 3/4 ее длины принадлежит к постоянной части. Под действием протеолитических ферментов молекула Ig расщепляется на F_c- и F_{ab}-фрагменты; фрагмент F_{ab}, разделяющий H-цепь, называется Fd-частью.

У человека и высших позвоночных известны два типа L-цепей (χ и λ) и 5 классов H-цепей (γ, α, η, δ, ε). Последние характеризуют 5 классов молекул (IgG, IgA, IgM, IgD и IgE), различных по иммунологическим свойствам. IgG-класс составляет основную массу иммуноглобулина нормальной сыворотки.

Открытие наследственного полиморфизма IgG принадлежит Граббу, обнаружившему, что сыворотка крови больных ревматоидным артритом обладает способностью агглютинировать эритроциты, сенсибилизированные неполными анти-D-антителами. Эта реакция, однако, в норме подавляется примерно у 60% людей европейского происхождения.



Система фосфоглюкомутазы **(*PZM_1*).** Фермент фосфоглюкомутаза является фосфотрансферазой, катализирующей перенос фосфатной группы из положения 1 в положение 6. Фермент широко распространен в живой природе и играет важную роль в углеводном обмене. Его активность проявляется не только в эритроцитах, но и в различных органах и тканях, а также в продуктах элиминации ксенобиотиков.

У различных людей наблюдаются три характерных типа изоферментных спектров, что дало основание для предположения о генетической природе подобной изменчивости и ее роли в метаболизме лекарств.

Система супероксиддисмутазы **(*SOD-A*)** – фермент, катализирующий окисление дихлорфенолиндофенола. Этот белок, обнаруживаемый во всех тканях, был отождествлен с супероксиддисмутазой, которая воздействует на весьма токсичные для клеток радикалы супероксида, в том числе лекарств и ксенобиотиков, с образованием перекиси водорода и кислорода. Существуют два варианта супероксиддисмутазы: митохондриальная форма SOD представлена в клетках всех тканей, за исключением эритроцитов; растворимая форма фермента наблюдается также и в эритроцитах. Первая разновидность супероксиддисмутазы относится к SOD-B и находится под контролем аллелей одного локуса, картированного в хромосоме 6. Вторая форма получила название SOD-A; локус, ответственный за ее детерминацию, находится на хромосоме 21.




Система экскреции **β*-аминоизомасляной кислоты*** **(*BAIB*).** Среди аминокислот, выделяемых из организма с мочой, наибольшее значение в антропологии имеет β-аминоизомасляная кислота (BAIB), полиморфизм экскреции которой в популяциях человека исследован пока недостаточно. Хроматографический аминокислотный анализ мочи, выделяет пятно, обозначаемое как «Т». Это вещество было идентифицировано как β-аминоизомасляная кислота – продукт деградации пиримидинового основания тимина. Интерес со стороны врачей и биологов к вариабельности экскреции BAIB обусловлен тем обстоятельством, что частота встречаемости выделителей большого количества BAIB при лечении препаратами пиримидинового ряда колеблется у разных народов в широких пределах: у большинства европейцев она незначительна, у негроидов составляет в среднем 20-30%, у монголоидов и ориенталов еще выше и отличается высокой дисперсией.

Сравнительно небольшая пропорция экскреторов отмечена среди русских и украинцев, что соответствует литературным данным о низкой их частоте среди населения Европы. Относительная доля выделителей в группе негров Западной Африки оказалась несколько

выше. Наибольшая частота фенотипа высокого уровня экскреции β-аминоизомасляной кислоты установлена в индийской и одной из эвенкийских групп.

Частота встречаемости лиц с высоким уровнем экскреции BAIB и оценка генных частот в некоторых этнорасовых группах: русские – 14,08% (0,375); украинцы – 12,50% (0,354); татары – 16,66% (0,408); казахи – 18,18% (0,426); арабы – 19,44% (0,441); латиноамериканцы – 19,05% (0,437); негры Западной Африки – 24,34% (0,493); индийцы – 36,36% (0,603); эвенки (Эконда, ДВФО) – 38,57% (0,612).

***Щелочная сывороточная фосфатаза* (*PGM*).** К настоящему времени стало известно, что кроме локусов АВО и Se, существуют, по-видимому, и другие генетические факторы, играющие роль в детерминации фенотипов щелочной сывороточной фосфатазы. Тот факт, что группы крови J и R некоторых домашних животных, аналогичные группам крови АВО человека, также имеют сходную с фенотипами Рр природу ассоциации, наводит на мысль о возможной существенной роли этой связи и ее значимости для фармакомоделирования.




При рассмотрении характера пространственного распространения типов щелочной фосфатазы среди населения Северной Азии следует обратить внимание, с одной стороны, на высокую частоту встречаемости среди северных монголоидов фенотипа Рр2, концентрация которого во многих случаях достигает и превышает 40%; с другой – на обнаруживающуюся высокую дисперсию распределения типов Рр, подобную распределению факторов АВО, что может явиться стимулом в этнофармакологии

В сводке ВОЗ указывается, что $PGM_{1.}$ достаточно широко распространен в популяциях Тихоокеанского бассейна, в частности среди китайцев и северных таиландцев, в Индии, у тибетцев Непала и австралийских аборигенов Квинсленда, а также в Японии [37]. Аллель PGM_1 с незначительной частотой представлена в нескольких префектурах Японии, у таиландцев, аборигенов Западной Малайзии, в некоторых популяциях Индии. У китайцев Индонезии этот ген обнаружен с частотой 2,4%.

Мы привели лишь несколько ферментных систем со «скамейки запасных». Их несравненно больше и, по-видимому, в обозримом будущем появятся новые знания, в соответствии с которыми новые ферментные «форварды» выведут свои команды в *премьер-лигу* наших представлений о фармакогенополиморфизме инновационных этнических лекарств.

Нужны ли этнические лекарства?

Генетический полиморфизм предопределяет индивидуальную чувствительность человека к лекарствам и ксенобиотикам [11]. Поиск оптимальных биомоделей, выбор трансгенных животных для исследований имеет решающее значение в оценке роли генетических факторов, определяющих терапевтическую эффективность и побочные явления при лечении. Существует, например, различная реакция на антихеликобактерную терапию: двойная схема лечения (омепразол + кларитромицин) была эффективна у 93% шведов и лишь в 63% случаев у японцев. Для представителей ашкенази (евреев с европейскими корнями) которые при лечении шизофрении и психопатии пользовались клозапином, велик риск серьезного заболевания крови, как правило, с летальным исходом.

Таблица 3.5

Непереносимость некоторых лекарственных средств в связи с особенностями генетического полиморфизма




Непереносимые лекарственные препараты	Распространение среди населения	Характер реакции	Дефектный фермент	Тип наследования
Более 120 лекарств, из них: акрихин и аналоги, аспирин и аналоги, сульфапиридазин и др. сульфаниламиды, фурадонин и другие фураны, дифенилсульфон, викасол, производ. анилина, ПАСК, левомицетин, новарсенол, толбутамид, БАЛ, фенилгидразин	Арабы, американские негры, греки, евреи, индонезийцы, курды, малайцы, новогвинейцы, пакистанцы, персы, румыны, сардинцы, сицилианцы, таи, филиппинцы, жители Южного Китая	Тяжелая гемолитическая анемия, резкие боли в пояснице и животе, обмороки, лихорадка	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	Сцепление с Х-хромосомой
Изониазид, фенилзин, гидралазин, дапсон, сульфадимезин	4,6% эскимосов, 13,3% японцев, 21,5% американских индейцев, 30% населения Кавказа, 32,8% латиноамериканцев, 50% населения США	Медленное ацетилирование препаратов вызывает повышение токсичности препаратов	Ацетилтрансфераза	Аутосомно-рецессивный
Перекись водорода, этиловый и метиловый спирт	В Японии и Швейцарии	Медленное разрушение препаратов. Усиление их токсичности	Каталаза	Аутосомно-рецессивный
Дитилин (замедление метаболизма)	1 случай на 2000 человек	Усиление токсичности	Псевдохолинэстераза	Аутосомно-рецессивный





Таблица 3.5 (*окончание*)

Непереносимые лекарственные препараты	Распространение среди населения	Характер реакции	Дефектный фермент	Тип наследования
Нитраты и нитриты, сульфаниламиды, левомицетин, ПАСК, фурадонин, хинин, парацетамол,	1% гетерозиготных	Метгемоглобинемия, цианоз	Глютатион-редуктаза, метгемоглобин-редуктаза	Аутосомно-рецессивный
Кортикостероиды в глазной практике	5% населения США	Глаукома	Неизвестно	Аутосомно-рецессивный
Варфарин	В двух больших семьях	Устойчивость к препарату	Неизвестно	Аутосомно-рецессивный
Вещества, содержащие группу N-C-S, фенилтиомочевина, метил- и пропилтиоурацил, фенилтиокарбамид	31,5% европейцев, 10,6% китайцев, 2,7% африканцев	Отсутствие ощущения вкуса разных веществ	Неизвестно	Аутосомно-рецессивный
Галотан, эфир, циклопропан, метоксифлуран	1 случай на 20 000 человек	Повышение температуры, мышечная ригидридность и смерть	Неизвестно	Аутосомно-рецессивный
Сердечные гликозиды, препараты, содержащие ганглиозиды и активирующие сахара	1/30 среди американцев еврейского происхождения и 1/300 среди прочих американцев	Болезнь Тея-Сакса, медленное разрушение ганглиозидов	β-N-ацетилгексозаминидаза	Аутосомно-рецессивный
Сульфаниламиды, нитриты, стрептомицин, неомицин, ненаркотические анальгетики	Жители средиземноморья (евреи, ливанцы, сирийцы и др.)	Резкое увеличение печени, гипогликемия, гиперурикемия, гиперлипемия	Амило-1,6-глюкозидаза	Аутосомно-рецессивный
Барбитураты, транквилизаторы, нейролептики, нитриты и нитраты	Афроамериканцы, гавайцы, таи, евреи, арабы Ближнего Востока	Увеличение печени, гипогликемия, обмороки, лихорадки	Киназа фосфорилазы	Связана с полом, сцепление с Х-хромосомой

Известно, что представители негроидной расы вдвое чаще по сравнению с белыми страдают от сердечной недостаточности и менее восприимчивы к действию препаратов, использующихся для лечения гипертонической болезни. По-видимому, возможной причиной является недостаток в организме представителей негроидной расы NO-вазодилятаторного медиатора. С этой целью американской компанией NitroMed разработан новый этнический препарат BiBil, по своим фармакологическим чертам являющийся донатором оксида азота. Препарат оказался эффективным в 66% случаев при лечении афро-американцев,



но не влиял на представителей белой расы. Управление по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в июле 2004 г. одобрило это первое «этническое лекарство» для лечения сердечной недостаточности у представителей негроидной расы.

Аллельная частотность генов, в которой кодируется информация о ферментах I и II фаз, описана в отношении целого ряда национальностей, выявлена их широкая этническая вариантность, однако отсутствуют данные о полиморфизме ферментов, участвующих в метаболизме лекарств, в том числе для русской нации, которая является самой многочисленной среди славянских народов. На путях создания этнических лекарств выполнены исследования генотипов некоторых генов, в которых закодирована информация о ферментах двух фаз, преобразующих лекарства, а также проведено сравнение полученных результатов у русских с соответствующими данными исследований у других наций [17]. Авторы попытались выяснить, являются ли русские люди генотипически схожими с другими кавказоидами или существует влияние Востока [17], воспользовавшись для этой цели возможностями фармакокинетики и оценки фармакогенополиморфизма.




Литература

1. *Бочков Р.П.* Генетика в современной кардиологии // *Вестник РАМН, № 5, 7, 2004.*
2. Геномика в медицине. – *М.: ИКЦ «Академкнига», 392 с., 2005.*
3. *Каркищенко Н.Н.* Лекарственная профилактика. – *М.: Воентехлит, 752 с., 2001.*
4. *Каркищенко Н.Н.* Через критерии подобия и аллометрии к валидации и экстраполяции в биомедицине // *Биомедицина, № 6, с.5-24, 2007.*
5. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. – *М.: Изд-во ВПК, 608 с., 2004.*
6. *Каркищенко Н.Н.* Фармакология системной деятельности мозга. – *Ростов н/Д: Ростовиздат, 1975.*
7. *Кукес В.Г.* Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. – *М.: Реафарм, 144 с., 2004.*
8. *Кукес В.Г., Фисенко В.П., Стародубцев А.К. и др.* Метаболизм лекарственных препаратов. – *М.: Палея, 2001.*
9. *Мартынов В.В., Малашенко А.М., Каркищенко В.Н., Бескова Т.Б.* Использование ДНК-маркеров для генотипирования инбредных линий лабораторных мышей // *Биомедицина № 6, с. 149-152, 2007.*
10. *Михельсон М.Я., Зеймаль Э.В.* Ацетилхолин. О молекулярном механизме действия // *Наука, 280 с., 1970.*
11. *Пашутин С.Б.* Этнические болезни и этнические лекарства. – *Лекс+, 326 с., 2007.*



12. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С.* Циклические преобразования азотной окиси у млекопитающих. – *М.: Наука, 1997.*
13. *Северин Е.С., Родина А.В.* Проблемы и перспективы современной противоопухолевой терапии // *Успехи биологической химии, т. 46, с. 43-64, 2006.*
14. *Середенин С.Б., Вахитова Ю.В., Вахитов В.А.* Молекулярно-биологические подходы к созданию геноспецифических фармакологических препаратов // *Экспер. и клин. фармакол., т. 64, № 3, с. 3-12, 2001.*
15. *Середенин С.Б.* Лекции по фармакогенетике. – *М.: МИА, 303 с, 2004.*
16. *Хуснутдинова Э.К.* Этногеномика и генетическая история народов Восточной Европы // *Вестник РАН, т. 73, № 7, с. 614-621, 2003.*
17. *Чернов Ю.Н., Гайкович Е.А., Ивар Роотс.* Генотипирование ферментов лекарственного метаболизма в русской популяции // *Клиническая фармакология в России. – М., 289-290, 2004.*
18. *Borst P., Evers R., Kool M. et al.* Family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins // *J. Natl. Cancer Inst.; 92:1295-1302, 2000.*
19. *Brinkmann U., Roots I., Eichelbaum M.* Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1: impact of polymorphisms on pharmacotherapy // *Drug Discov Today; 6:835-839, 2001.*
20. *Cavalh-Sforza L.L.* Genes, Peoples and Languages // *N.Y.: North Point Press, 2000.*




21. *Choo E.F., Leake B., Wandel C. et al.* Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes // *Drug Metab Dispos 28:655-660, 2000.*
22. *Cruciani F., Santolamazza., Shen P. et al.* A back migration from Asia to Sub-Saharan Africa is supported by high- resolution analysis of human Y-chromosome hap-lotypes // *Am. J. Hum. Gen. V. 70. P. 1197-1214, 2002.*
23. D*iasio R.B., Beavers T.L., Carpenter J.T.* Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase: biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity // *J. Clin. Invest. 81, 47-51, 1988.*
24. *Evans W.E., Johnson J.A.* Pharmacogenomics: the inherited basis for inter-individual differences in drug response // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.; 2:9-39, 2001.*
25. *Evans W.E., Relling M.V.* Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics // *Science; 286:487-491, 1999.*
26. *Fellay J., Marzolini C., Meaden E.R. et al.* Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study // *Lancet; 359:30-36, 2002.*
27. *Hoffmann R., Torrens V.* The same or not the same, in chemistry imagined // *Oxford, 98-106, 2006.*
28. *Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O. et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 97:3473-3478, 2000.*
29. *Kalow W., Tang B.K., Endrenyi I.* Hypothesis: comparisons of inter- and

intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research // *Pharmacogenetics; 8:283-289, 1998.*

30. *Karkischenko N.N., Maklakov U.S., Stradomsky B.V.* For investigation on the mechanisms of protective influence of neuropsychotropic drugs on lymphocyte efector function in stress conditions // *1st Int. Congr. ISNIM. Florence. Italy, p. 94, 1990.*
31. *Karkishchenko N.N.* Uridine: possible endogenus anxiolytic // *Abstr. of the 6th General Meet. of the Europe Soc. For Neurochemistry: "Molecular basis of neural function", Prague, 1986.*
32. *Kim R.B., Leake B.F., Choo E.F. et al.* Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans // *Clin. Pharmacol. Ther.; 70:189-199, 2001.*
33. *McLeod H.L., Evans W.E.* Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better drug therapy // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.; 41:101-121, 2001.*
34. *Ramoshebi L.N., Matsaba T.N., Teare J. Renton L. et al.* Tissue engineering: TGF-p superfamily members and delivery systems in bone regeneration // *Expert Reviews in Molecular Medicine, 4, 1-11, 2002.*
35. *Rao V.V., Dahlheimer J.L., Bardgett M.E. et al.* Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 96:3900-3905, 1999.*
36. *Rosser Z.H., Zerjal T., Hurles M.E. et al.* Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language // *Am. J. Hum. Genet. V. 67. P. 1526-1543, 2000.*
37. *Sakaeda T., Nakamura T., Horinouchi M. et al.* MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects // *Pharm. Res.; 18:1400-1404, 2001.*
38. *Schinkel A.H., Wagenaar E., Mol C.A., van Deemter L.* P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs // *J. Clin. Invest; 97:2517-2524, 1996.*
39. *Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H. et al.* Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 84:7735-7738, 1987.*
40. *Thomson R., Pritchard J., Shen P. et al.* Recent common ancestry of human Y chromosomes: Evidence from DNA sequence data // *Proceedings of National Academy of Sciences, v. 97, No. 13, p. 7360-7365, 2000.*
41. *Van Kuilenbburg A.B.P., Vreken P., Abeling N.G. et al.* Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency // *Hum. Genet. 104, 1-9, 1999.*
42. *Vesell E.S.* Pharmacogenetic perspectives gained from twin and family studies // *Pharmacol Ther.; 41:535-552, 1989.*
43. *Weinshilboum R.* Inheritance and drug response // *N. Engl. J. Med.; 348:529-537, 2003.*